CHARAKTERISIERUNG UND LOKALISIERUNG VON ATPasen, PROTONENPUMPEN UND IONENTRANSPORT-PROZESSEN AN MIKROSOMALEN MEMBRANEN VON MAISKOLEOPTILEN

DISSERTATION
zur Erlangungung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhardt-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
WOLFGANG BIBER
aus Ellwangen (Jagst)

1984

CHARAKTERISIERUNG UND LOKALISIERUNG VON ATPasen, PROTONENPUMPEN UND IONENTRANSPORT-PROZESSEN AN MIKROSOMALEN MEMBRANEN VON MAISKOLEOPTILEN

DISSERTATION
zur Erlangungung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhardt-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
WOLFGANG BIBER
aus Ellwangen (Jagst)

1984

Tag der mündlichen Prüfung	25. 7. 1984
Dekan	Prof. Dr. E. Kulzer
1. Berichterstatter	Prof. Dr. A. Hager
2. Berichterstatter	Prof. Dr. H.-U. Seitz

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	5
2.1. Chemikalien und Abkürzungen	5
2.2. Medien und Reagenzien	6
2.3. Saatgut und Anzucht	7
2.4. Präparation mikrosomaler Vesikel	7
2.5. Zellfraktionierung durch Dichtegradientenzentrifugation	9
2.6. Flammenspektrometrische Bestimmung von Alkaliionen	11
2.7. Test auf Protonenakkumulation in mikrosomalen Vesikeln	11
2.8. ATPase-Tests	12
2.8.1. Bestimmung der ATP-Hydrolyserate mit Hilfe der Luciferin-Luciferasemethode	12
2.8.2. Bestimmung der Phosphatfreisetzung nach CHEN et al. (1956)	13
2.9. Weitere Enzymtests	14
2.9.1. Proteinbestimmung nach LOWRY et al.(1951)	14
2.9.2. Cytochrom-C-Oxidase	14
2.9.3. Cytochrom-C-Reduktase	14
2.9.4. Saure Phosphatase	15
2.9.5. ß-Mannosidase	16
2.9.6. Latente IDPase	16
2.9.7. Glucansynthetasen I und II	16
3. Ergebnisse	18
3.1. Aufnahme von Indikatorfarbstoffen ins Vesikelinnere	18
3.2. Zellfraktionierung	22
3.2.1. Verteilung der Organellen im Gleichgewichtsgradienten	22
3.2.2. Verteilung der ATPasen im Saccharosegradienten	28
3.2.3. Verteilung der Protonenpumpen im Saccharosegradienten	37

3.3. Charakterisierung von Protonenpumpen 39
3.3.1. Anionenabhängige Protonenpumpen am Tonoplasten 39
3.3.2. Beeinflussung der intravesikulären Ansäuerung durch Kationen 43
3.3.3. Charakterisierung von Protonenpumpen am Plasmalemma 53
4. Diskussion 56
5. Zusammenfassung 64
6. Literaturverzeichnis 66

1. Einleitung

Eine zentrale Rolle im Stoffwechsel pflanzlicher und tierischer Zellen nehmen ATPasen ein. Sie katalysieren in Mitochondrien und Chloroplasten, gemäß der chemiosmotischen Hypothese nach MITCHELL (1961), unter Ausnutzung eines Protonengradienten, die Synthese von ATP. Im umgekehrten Fall tragen sie, wie dies in allen energieverbrauchenden Zellorganellen geschieht, zur Energieumwandlung via ATP-Hydrolyse bei.

Einen bedeutenden Rang nehmen diejenigen ATPasen ein, bei welchen ein Zusammenhang mit dem aktiven Stofftransport nachgewiesen wurde. Sie sind an Membranen gebunden und arbeiten als elektrogene Pumpen (SPANSWICK 1981). Energetisiert werden sie durch ATP; die Möglichkeit der Umwandlung von Redox-Energie (RAVEN und SMITH 1977; LIN 1984) wird heute kaum mehr diskutiert. In der Regel werden durch die sog. H^+-ATPasen primär Protonen durch eine Membran bewegt (POOLE 1978); bilden die Membranen geschlossene Kompartimente, welche impermeabel für Protonen sind, so bedingt jede H^+-Verschiebung zunächst den Aufbau eines elektrischen Potentials. Die resultierende elektromotorische Kraft kann dann beispielsweise zum Cotransport von Anionen eingesetzt werden, wie dies schon mehrfach an mitochondrialen Membranen gezeigt wurde (PALMIERI und STIPANI 1981). Ebenso besteht auch die Möglichkeit eines elektroneutralen Austausches zwischen Protonen und Kationen, wie etwa dem Ca^{2+} (BREY und ROSEN 1979; HAGER und HERMSDORF 1981). Schließlich können auch neutrale Moleküle, wie GUY et al. (1979), THOM et al. (1982) soewie De KLERK-KIEBERT et al. (1983) dies für die Zuckeraufnahme bei Erbsen, Zuckerrohr und Sojabohnen gezeigt haben, gegen ein Diffusionsgefälle eine Membran durchqueren. In diesen Fällen wird ein Carrier an der einen Seite der Membran protoniert und kann, entsprechend einem Potentialgefälle in der Membran gedreht oder transportiert werden; das neutrale Molekül, welches am Carrier bindet, wird so mittransportiert. - HODGES (1976) und LEIGH (1983) listen wei-

tere Beispiele für Transportmöglichkeiten an Plasmalemma- und Tonoplastenmembranen auf.

Protonenpumpen werden an verschiedenen Zellorganellen postuliert: Sie werden verantwortlich gemacht für den Stofftransport in die Vakuole, z. B. für die Malataufnahme bei CAM-Pflanzen (GANSER et al. 1982), die Citrataufnahme bei Hevea (MARIN et al. 1982), sowie für die Akkumulation von Saccharose bei Rübenwurzeln (LEIGH et al. 1979) wie auch Anthocyan und anderen sekundären Pflanzenstoffen bei Meerrettichwurzeln (GROB und MATILE 1979). Auch am Plasmalemma müssen Protonenpumpen gefordert werden, um der Hypothese des säureinduzierten Streckungswachstums nach RAYLE und CLELAND (1970) sowie HAGER et al. (1971) gerecht zu werden. Diese Pumpen müssen durch Auxin oder das pflanzliche Toxin Fusicoccin direkt oder indirekt aktivierbar sein (HASCHKE und LÜTTGE 1977; BIGDON und BÖTTGER 1982); Orthovanadat gilt als Hemmstoff dieser Pumpen (COCUCCI et al. 1980; JACOBS und TAIZ 1980). Durch das Einschleusen von Protonen in die Zellwand werden deren Bausteine plastisch dehnbar, wodurch ein Streckungswachstum ermöglicht wird; auf dieser Ebene muß deshalb auch die Ursache verschiedener Bewegungen, wie Geo- und Phototropismus,liegen, welche in der Vergangenheit Anlaß zu heftigen Diskussionen gaben (HAGER 1971).

In den letzten Jahren haben sich die Versuchsansätze zum Bestimmen und Charakterisieren der Protonenpumpen immer mehr auf in-vitro-Systeme verlagert. Seit der ersten Reinigung einer pflanzlichen Plasmalemma-ATPase durch HODGES et al.(1972) häufen sich die Publikationen über Versuche, ATPase-Experimente an Membranvesikeln (MARMÉ et al. 1982) oder an Liposomen (KAGAWA 1982; MALPARTIDA und SERRANO 1981) durchzuführen. Die geringe Größe der Zellorganellen, welche bis dahin das Haupthindernis bei der direkten Untersuchung bildete, verlangte die Einführung neuer Meßmethoden, wie Potentialbestimmungen mittels radioaktiv markierter Substanzen (METTLER et al. 1982), oder Fluoreszenzfarbstoffen (SONE et al. 1976). Außerdem wurde es

möglich, Protonenverteilungen und -fluxe mit Hilfe neuer Meßmethoden direkt zu messen (GILLIES und DEAMER 1979).

Leider wurden viele Angaben über mutmaßliche H^+-ATPasen unter verschiedenen Autoren oft unterschiedlich interpretiert. Dies galt zum einen der Funktionsweise der ATPasen, sei es, daß Substrate, Stimulatoren oder Inhibitoren untersucht wurden. In nur wenigen Gesichtspunkten stimmen alle Autoren überein: Protonentranslocierende ATPasen sind im Bezug auf das ATP sehr substratspezifisch, sie spalten im Gegensatz zu den unspezifischen Phosphatasen nicht das künstliche Substrat p-Nitrophenylphosphat. Ferner benötigen diese Pumpen zweiwertige Kationen, um das ATP dem Enzym als Komplex zugänglich zu machen; hier werden Mg^{2+} und Mn^{2+} bevorzugt. Außerdem sind eine Reihe von Hemmstoffen, wie N,N'-dicyclohexylcarbodiimid und organischen Quecksilberverbindungen bekannt; MARIN (1983) fand für Tonoplasten-ATPasen sechs weitere Hemmstoffe, stellte aber andererseits bei 17 von verschiedenen Autoren benutzten ATPasehemmern keine Inhibition fest. Schließlich wurde die Tatsache benutzt, daß protonenpumpende ATPasen in ihrer Tätigkeit eine Stimulierung erfuhren, wenn Protonophoren zugegeben wurden (SZE 1980; DuPONT et al. 1982; POOLE et al. 1984), wodurch der Protonengradient zusammenbrach und der Eintransport von H^+ erleichtert wurde.

Zum zweiten spielt die Herkunft der Vesikelpopulation eine Rolle. Zwar haben schon mehrere Arbeitsgruppen versucht, Zellfraktionierungen mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation vorzunehmen (QUAIL 1979), doch können die Ergebnisse nicht unbedingt miteinander verglichen werden, weil die einzelnen Zellkompartimente entweder nach Dichte oder nach Sedimentationsgeschwindigkeit getrennt wurden (WAGNER und MULREADY 1983; CHURCHILL et al. 1983), oder weil das Trägermedium variierte (DeMICHELIS et al. 1983; MANDALA et al. 1982; LEONG et al. 1981; WIDELL et al. 1982), oder weil die verwendete Ionenzusammensetzung verschieden war. Unterschiede in der Verteilung im Dichtegradienten waren die Folge (ROBINSON et al. 1982). So führte HALL (1983) allein zehn

verschiedene Arbeitsgruppen auf, die Plasmamembranen isolierten. Dabei hatte die Äquilibrationsdichte im Gradienten, selbst wenn ein und dasselbe Pflanzenmaterial verwendet wurde, oft enorme Schwankungen.

Ziel der Untersuchungen war es, an einem physiologisch gut untersuchten Objekt, der Maiskoleoptile, ATP-getriebene Protonenpumpen mittels Zellfraktionierung den zugehörigen Zellorganellen zuzuordnen. Darüberhinaus sollten die H^+-ATPasen mit Hilfe geeigneter Substrate und Inhibitoren näher charakterisiert werden. Im Vordergrund stand dabei die Möglichkeit einer in-vivo-Regulation dieser Enzyme. Die Versuche sollten deshalb nicht, wie in den meisten vorangegangenen Publikationen, auf rein artifiziellen Bedingungen aufgebaut sein.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Abkürzungen

9-AA	9-Aminoacridin	SERVA
AMP	Adenosin-5-Monophosphorsäure	SERVA
ANS	1-Anilinonaphthalinsulfonsäure	ICN
ATP	Adenosin-5-triphosphorsäure	FLUKA
BICIN	N,N'-bis(2-Hydroxyethyl)glycin	MERCK
BSA	Rinderserumalbumin (Frakt. V, entfettet)	SERVA
CCCP	Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon	SERVA
CytC	Cytochrom C	BÖHRINGER
DCCD	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid	SIGMA
DTT	DL-Dithiothreit	SIGMA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	MERCK
EGTA	Ethylenglycol-bis-(ß-Aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure	SIGMA
HEPES	N-(2-Hydroxymethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure	SERVA
IDP	Inosin-5-diphosphorsäure	SIGMA
MES	N-Morpholinoethansulfonsäure	SERVA
MOPS	N-Morpholinopropansulfonsäure	SIGMA
NEM	N-Ethylmaleimid	SERVA
NADH	ß-Nicotinamid-adenin-dinucleotid (red.)	BÖHRINGER
NR	Neutralrot	MERCK
pHMB	4-Hydroxymercuribenzoesäure	SERVA
pNP	4-Nitrophenylphosphorsäure	MERCK
pNM	4-Nitrophenyl-ß-D-Mannopyranosid	BÖHRINGER
QA	Quinacrin	SERVA
TCA	Trichloressigsäure	MERCK
TMT	Trimethylzinnchlorid	ICN
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan	SIGMA
^{14}C-UDPG	Uridin-5'-diphosphoglucose	AMERSHAM

Vanadat wurde, wie bei GALLAGHER und LEONARD (1982) beschrieben, aus V_2O_5 hergestellt. Weitere Abkürzungen: EK = Endkonzentration; FG = Frischgewicht; UpM = Umdrehungen pro Minute.

2.2. Medien und Reagenzien

- Plasmolysemedium:
  450 mM Saccharose
  10 mM HEPES/KOH, pH 7,5

- Homogenisiermedium:
  300 mM Saccharose
  75 mM HEPES/KOH, pH 7,5
  10 mM EGTA
  20 mM Ascorbinsäure
  2,5 mM DTT
  0,1 % BSA (w/v)

- Suspensionsmedium:
  300 mM Saccharose
  10 mM HEPES/KOH, pH 7,5
  1 mM $MgSO_4$
  0,1 % BSA (w/v)

- Gradientenmedien:
  15 bzw 45 % Saccharose (w/w)
  1 mM DTT
  0,5 mM EGTA
  5 mM HEPES/KOH, pH 7,5 oder
  5 mM MOPS/KOH, pH 7,5
  0,1 % BSA (w/v)

- Reagens C zur Phosphatbest.:
  3 M H_2SO_4
  2,5 % Ammoniummolybdat (w/v)
  10 % Ascorbinsäure (w/v)
  Je ein Teil dieser Komponenten plus 2 Volumenteile Wasser ergeben das Reagens. Das Probevolumen muß mit H_2O auf 2 ml aufgefüllt werden; dazu werden 2 ml Reagens C gegeben.

- Reagens zur Proteinbestimmung:
  2 % Na-K-Tartrat (w/v) 2 ml
  1 % $CuSO_4$ x 5 H_2O (w/v) 2 ml
  4 % Na_2CO_3 96 ml
  Die Komponenten werden nacheinander in ein Gefäß überführt.

2.3. Saatgut und Anzucht

Für alle Versuche wurde mit CAPTAN gebeiztes Saatgut von Zea Mays L. verwendet. Lieferant: Fa. Nungesser KG, Darmstadt; Sorte Inrafrüh, Hybridmais, Kat. 4b.

80 g Maiskaryopsen wurden ca. 5 Stunden in fließendem Wasser vorgequollen, wobei gleichzeitig das anhaftende Beizmittel entfernt wurde. Danach wurden diese in einer JIFFY-Schale (60 x 22 cm) auf einer mit 350 ml aqua dest angefeuchteten Lage Zellstoff ausgelegt und mit einem dicht schließenden Deckel verschlossen.

Die Anzucht (90 bis 96 Stunden) erfolgte bei 26°C und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit bei grünem Sicherheitslicht und bei täglich 2 Stunden Rotlichteinstrahlung (SYLVANIA-Leuchtstofflampen). Dabei kommt es nur zu sehr geringer Ausbildung von Chlorophyllen; ferner wird das Mesokotylwachstum gehemmt.

Zur Präparation wurden alle Maiskeimlinge benutzt, bei denen das Primärblatt die Koleoptilenspitze noch nicht durchstoßen hatte.

2.4. Präparation mikrosomaler Vesikel

Die geeigneten Maiskeimlinge wurden knapp oberhalb des Knotens abgeschnitten, das Primärblatt durch Aufschlitzen der Koleoptile entfernt und verworfen, die Koleoptile unter Eiskühlung bis zur weiteren Präparation aufbewahrt.

Um ein Aufbrechen von Zellorganellen während der Homogenisation möglichst zu vermeiden und ein besseres Ablösen des Plasmalemmas von der Zellwand zu erreichen, wurde zunächst eine Plasmolyse durchgeführt. Dazu wurden die Koleoptilen (in den meisten Fällen 10 g FG) in 100 ml Plasmolysemedium 10 Minuten im Wasserstrahlvakuum infiltriert. Danach wurde dieses Medium abdekantiert und die Koleoptilen in eine Petrischale überführt.

Hier wurden 3,5 ml/g FG Homogenisiermedium zugegeben, und die Koleoptilen mit einer Rasierklinge in ca. 1 mm^2 große Stückchen zerhackt. Das entstandene Rohhomogenat wurde, um größere Zelltrümmer zurückzuhalten, durch drei Lagen Verbandsmull gepreßt. Es folgte eine Vorzentrifugation von 15 Minuten bei 10 000 x g (≙ 9 000 UpM im BECKMAN-Rotor JA 20). Das entstandene Pellet, bestehend aus Zellwandbruchstücken und größeren Organellen, einschließlich Mitochondrien, wurde verworfen und der Überstand sofort weiterverwendet.

Um ein mikrosomales Pellet zu erhalten, wurde der 10 000 g-Überstand 30 Minuten bei 143 000 x g (≙ 35 000 UpM im BECKMAN-Rotor 45 Ti) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das 143 000 g-Pellet (= mikrosomales Pellet) wurde in 1,2 ml/g FG Suspensionsmedium aufgenommen und mit einem Homogenisator nach POTTER-ELVEHJEM durch drei vorsichtige Stöße unter leichtem Drehen aufsuspendiert. Das Homogenat war nun für mehrere Stunden für die Versuche verwendbar, es mußte aber, wie dies bei allen vorhergehenden Präparationsschritten notwendig war, unter Eiskühlung aufbewahrt werden.

Bei manchen Versuchen wurde die Methode folgendermaßen geändert:

1. Anstatt der 143 000 g-Zentrifugation wurde nur 30 Minuten bei 48 800 x g (≙ 20 000 UpM im JA 20-Rotor) zentrifugiert. Bei dieser geringeren Beschleunigung pelletierten allerdings nur etwa 3/4 der mikrosomalen Membranen, wie dies durch Proteinbestimmungen ermittelt wurde.
2. Für Versuche, bei denen das mikrosomale Pellet sofort weiterverwendet wurde, konnte die Ascorbinsäure im Homogenisiermedium, sowie das Rinderserumalbumin in allen drei Medien weggelassen werden.
3. Wenn nötig, wurden die Medien nicht wie angegeben mit KOH, sondern mit LiOH, CsOH oder Tris auf pH 7,5 oder andere pH-Werte titriert.

2.5. Zellfraktionierung durch Dichtegradientenzentrifugation

Die Aufarbeitung des Rohhomogenates erfuhr folgende Änderungen:

1. Verwendung von 1 ml Homogenisiermedium pro g FG.
2. Das Homogenisiermedium enthielt zusätzlich 1 mM EDTA und wurde auf pH 7,8 eingestellt.
3. Die Vorzentrifugation wurde, um Plasmalemmaverluste in Grenzen zu halten und gleichzeitig Kontamination durch Mitochondrien zu verhindern, 20 Minuten bei 6 000 x g (≙ 7 000 UpM im JA 20-Rotor) durchgeführt (NAGAHASHI und HIRAIKE 1982).

Danach wurden 28 ml eines kontinuierlichen Saccharosegradienten (15 - 45 % w/w) mit 11 ml des 6000 g-Überstandes überschichtet und 15 Stunden lang im BECKMAN-Rotor SW 28 bei 110 000 x g (≙ 25 000 UpM) zentrifugiert. Während dieser Zeit ordnen sich alle Partikel entsprechend ihrer Dichte im Saccharosegradienten an (isopyknischer Gradient). Dach der Zentrifugation wurde der Gradient geerntet, indem das Röhrchen am Boden angestochen und durch eine Hohlnadel dichte Zuckerlösung unter die Gradientenlösung gepreßt wurde, um diese langsam nach oben in eine aufsitzende Durchflußküvette zur Extinktionsbestimmung zu verdrängen (ISCO density gradient fractiometer 185). Dann wurde die Gradientenlösung in Fraktionen von je 1,5 bis 1,8 ml geteilt und mit einem Refraktometer auf die Saccharosedichte hin untersucht. Bis zum weiteren Gebrauch wurden die Fraktionen auf Eis aufbewahrt.

Abb. 1 zeigt schematisch die bisher erwähnten Aufbereitungsschritte.

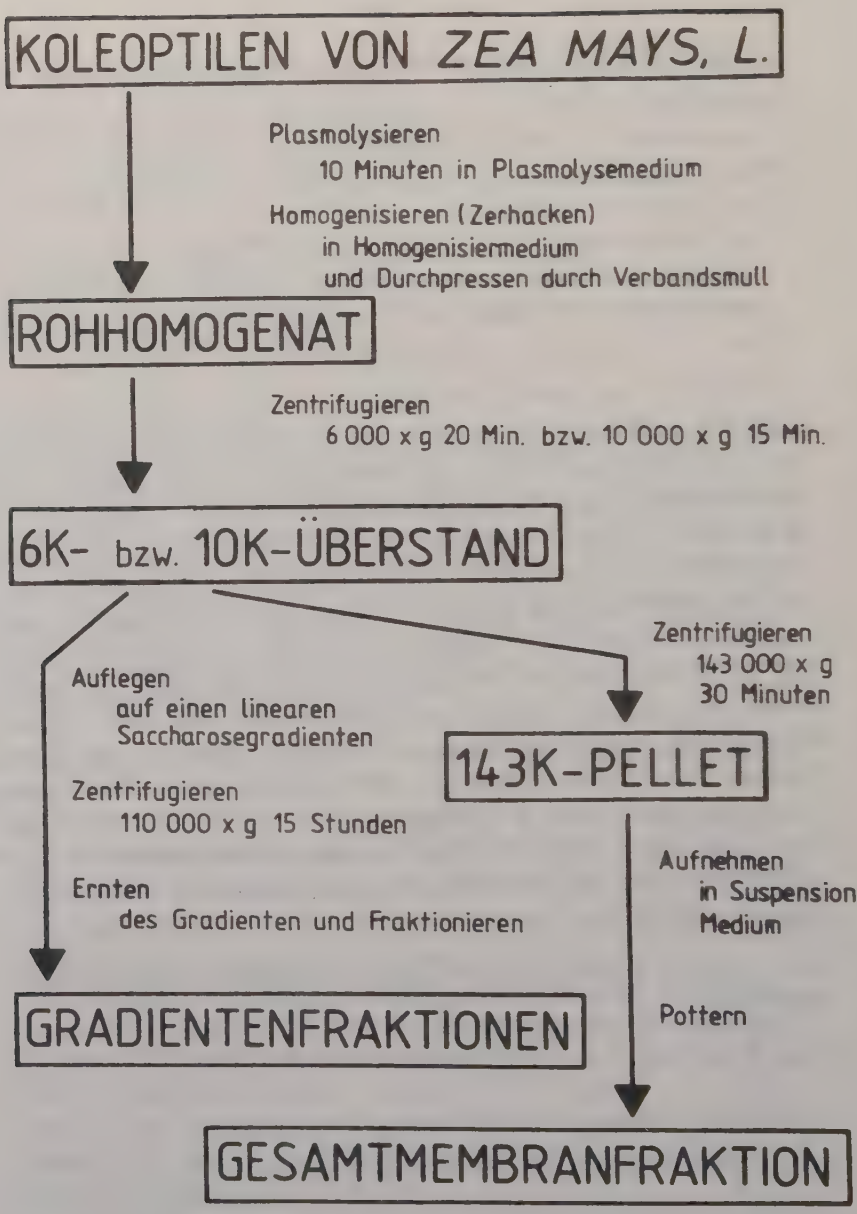

Abb. 1: Schematischer Arbeitsgang der Membranisolierung

2.6. Flammenspektrometrische Bestimmung von Alkaliionen

Die Aufbereitung der mikrosomalen Vesikel erfolgte wie unter 2.2. beschrieben; lediglich bestimmte, zur Untersuchung kommende Alkaliionen wurden in Form von Chloridsalzen dem Homogenisier- bzw. Suspensionsmedium beigemengt.

Jeweils 3 ml Vesikelsuspension (0,25 bis 0,3 mg Protein/ml) wurden für 20 bis 30 Minuten nach ATP-Zugabe im Wasserbad bei bei 23°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch das Absaugen des umgebenden Mediums auf einem Membranfilter (SARTORIUS Type 66, Porengröße 0,45 µm, Durchmesser 25 mm, Material Cellulosenitrat) gestoppt. Nach dem Waschen mit 3 x 1 ml Suspensionsmedium ohne das zu messende Ion wurde der Filter mit den Membranvesikeln in ein Bombenrohr überführt und nach Zugabe von 100 bis 200 µl konz. HNO_3 bei 210°C für 30 Minuten verascht. Der Rückstand wurde mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt und direkt in den BECKMAN Atomic Absorption Spektrophotometer 1272 eingegeben. Mit Hilfe eines Flammenemissionsspektrums (verwendete Wellenlängen: K 766,49 nm; Rb 780,02 nm; Li 670,78 nm) wurde der Gehalt der gewünschten Alkaliionen bestimmt. Als Vergleich diente jeweils eine Probe, welche anstatt mit ATP mit AMP inkubiert wurde.

2.7. Test auf Protonenakkumulation in mikrosomalen Vesikeln

Ein Protonengradient quer zu einer Membran läßt sich unter Zuhilfenahme von Indikatorfarbstoffen sichtbar machen. Für die Versuche wurden die Indikatoren 9-Aminoacridin, Quinacrin und Neutralrot verwendet.

Neutralrot wurde mit 33 µM oder 40 µM Endkonzentration zu einem Probevolumen von 1 ml gegeben. In einem Double Beam / Difference / Dual Wavelength Recording Photometer der Firma Shimadzu wurde die Ansäuerung der Vesikel nach Zugabe von 1 mM ATP gemessen, und zwar als zeitabhängige Absorptionsänderung im Dual Wavelength-Verfahren. Dabei betrug die Meß-

wellenlänge 430 nm und die Referenzwellenlänge 465 nm; letztere entspricht dem isosbestischen Punkt des NR in Anwesenheit von Membranen (HAGER und HELMLE 1981). Beim Messen von Gradientenfraktionen, bei denen wenig Probevolumen vorhanden war, wurden zu 450 µl Gradientenlösung 50 ul Reaktionsmix (Endkonzentrationen: 2 mM $MgSO_4$, 50 mM Chloridsalz oder 25 mM organisches Anion, 40 µM Neutralrot und etwaige andere Reagenzien) zupipettiert; die Messung erfolgte nach dem Start der Reaktion durch 2 mM ATP am HEWLETT-PACKARD HP 8450 A - Spektrophotometer. Es wurden in zwei-Minuten-Abständen Absorptionsdifferenzen gemessen, bei pH 7,5 $\Delta A_{490-430}$ und bei pH 7,0 $\Delta A_{480-430}$; die erste Wellenlänge entspricht der Zunahme von NRH^+, die zweite der Abnahme von NR (HAGER et al 1980).

Die Fluoreszenzfarbstoffe 9-Aminoacridin und Quinacrin wurden mit einer Endkonzentration von 7,5 µM ebenfalls zu einem Probevolumen von 1 ml gegeben. Die Messung erfolgte in einem FOCI-Spektrofluorometer 147 150. Bei einer anregenden Wellenlänge von 422 nm für das 9-AA wurde die Fluoreszenzabnahme bei 455 nm als zeitliche Kinetik verfolgt; beim QA betrug die anregende Wellenlänge 425 und die emittierte 505 nm (LEE und FORTE 1978).

2.8. ATPase-Tests

2.8.1. Bestimmung der ATP-Hydrolyserate mit Hilfe der Luciferin-Luciferasemethode

900 µl Probe wurden mit 100 µl 10 mM ATP-Lösung gemischt und in Zeitabständen von je 5 Minuten, beginnend sofort nach dem Start der Reaktion, Aliquots von je 200 µl entnommen. Diese wurden sofort mit 200 µl eiskalter 10 %iger TCA vermengt und 15 Minuten bei 12 400 x g (BECKMAN-Mikrofuge 12) zentrifugiert. Die Sedimente wurden verworfen und die Überstände wurden mit aqua bidest in der Regel 1:100 oder 1:200 verdünnt, sodaß die ATP-Konzentration zwischen 0,1 und 10 µM lag.

Die Messung erfolgte im LKB-WALLAC-Luminometer 1250. Ein Ansatz bestand aus 100 ul verdünnter Probe, 150 µl ATP-Monitoring Reagent CLS (BÖHRINGER) und 750 µl Puffer (50 mM Tris-HAc, pH 7,75 und 1 mM EGTA). Auf die Messung eines internen Standarts konnte verzichtet werden, weil infolge der starken Probenvorverdünnung kaum Lumineszenzquench eintrat. Die absoluten ATP-Konzentrationen wurden mit Hilfe einer Eichkurve, bei der die Lumineszenz bekannter ATP-Konzentrationen bestimmt wurde, ermittelt. Alle Versuche wurden in dreifachen Ansätzen durchgeführt. Die Differenz der ATP-Gehalte bei Reaktionsbeginn minus der ATP-Gehalte der Aliquots diente als Maß für die ATPase-Aktivitäten.

2.8.2. Bestimmung der Phosphatfreisetzung nach CHEN et al. (1956)

100 ul einer Membranfraktion wurden mit 400 µl Reaktionsgemisch, bestehend aus ATP, $MgSO_4$, Puffer, Salzen, und weiteren Reagenzien, welche im Ergebnisteil beschrieben sind, gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten bei 35°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 3,5 ml Reagens C gestoppt.

Innerhalb von 90 Minuten bildete sich bei 35°C aus dem freigesetzten P_i und dem Reagens C ein reduzierter Phosphomolybdatkomplex, dessen Farbintensität nach einigen Minuten des Abkühlens auf Zimmertemperatur am ZEISS M 4 Q III-Photometer bei 820 nm gemessen wurde. Für jeden Test, der in zwei Ansätzen durchgeführt wurde, mußte eine Blindprobe, bei der anstatt der Membranfraktion 100 µl Gradientenfraktion ohne Vesikel zupipettiert wurde, durchgeführt werden. Die Extinktionsdifferenz zwischen Probe und Blindprobe diente als Maß für die Freisetzung von anorganischem Phosphat. Die absolute Menge dieses Phosphats wurde anhand einer Eichkurve, bei der die Extinktionen bekannter Phosphatmengen bestimmt wurden, ermittelt.

2.9. Weitere Enzymtests

2.9.1. Proteinbestimmung nach LOWRY et al. (1951)

500 µl der zu untersuchenden Vesikelsuspension wurden mit 200 µl 10 %iger TCA versetzt und 10 Minuten bei 12 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und das Sediment in 0,5 ml 0,1 M NaOH resuspendiert. Für jede Probe wurde ein doppelter Ansatz hergestellt.

Die Reaktion wurde nach Zugabe von 2,5 ml Reaktionsgemisch gestartet; nach 10 Minuten wurden 0,25 ml Folin-Chiocalteus-Phenolreagens (MERCK) zupipettiert. Der sich mit dem Tyrosin-Anteil der Probe bildende blaue Farbkomplex wurde nach weiteren 20 Minuten photometrisch bestimmt (Eppendorf-Photometer mit Absaugvorrichtung; Extinktion 691 oder 571 nm). Als Standart diente Rinderserumalbumin.

2.9.2. Cytochrom-C-Oxidase

Die Cytochrom-C-Oxidase ist ein Leitenzym der inneren Mitochondrienmembran (COOPER und BEEVERS 1969). Der Test wurde wiefolgt durchgeführt: Um die Membranen zu zerstören, wurden zu 20 µl Probe 50 µl einer Digitoninsuspension (0,75 mg/ml) gegeben. Nach 10 Minuten wurde 1 ml Reaktionslösung, bestehend aus 100 mM K-Phosphat, pH 7,5 und 0,5 mg dithionit-reduziertes CytC zugegeben. Die Oxidation des CytC wurde im Photometer bei 25°C und einer Wellenlänge von 550 nm verfolgt; die Zunahme der Extinktion pro Zeiteinheit diente als Maß für die Enzymaktivität (HODGES und LEONARD 1974).

2.9.3. Cytochrom-C-Reduktase

Die NADH- und NADPH-abhängige Cytochromreduktase ist auf dem Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Sie unterschei-

det sich von den entsprechenden Enzymen der Mitochondrien dadurch, daß sie durch Antimycin nicht hemmbar ist (De PIERRE und ERNSTER 1977). Zu 1 ml einer Lösung, bestehend aus 100 mM K-Phosphat, pH 7,5, 1 µM Antimycin A und 0,5 mg CytC, wurden 50 µl Probe (eventuell vorverdünnt) pipettiert. Außerdem wurden, um die mitochondriale Cytochrom-C-Oxidase zu hemmen, 50 µl einer 60 mM KCN-Lösung zugegeben. Die Absorption bei 550 nm wurde 3 Minuten lang verfolgt, dann wurden 10 µl einer 5 mM NADH-Lösung zugegeben und die Extinktionsänderung weiterverfolgt. Die Differenz der Extinktionsänderung vor und nach der NADH-Zugabe wurde als Maß für die Enzymaktivität verwendet (HODGES und LEONARD 1974, verändert).

2.9.4. Saure Phosphatase

Die Saure Phosphatase ist ein Markerenzym für intakte Vakuolen, weil das Enzym hier in gelöster Form lokalisiert ist (LEIGH und WALKER 1980). Diese Phosphatase unterscheidet sich von membrangebundenen Phosphatasen durch ihre Sensitivität gegenüber Molybdat (GALLAGHER und LEONARD 1982). Weil die Saure Phosphatase auch unspezifische Substrate spaltet, wurde im Test p-Nitrophenylphosphat verwendet. Zu 200 µl 5 mM pNP und 200 µl 100 mM MES, pH 5,5, wurden 20 ul Probe (eventuell vorverdünnt) zupipettiert. Die Inkubationszeit betrug bei 25°C 30 Minuten, dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 800 µl einer 200 mM Boratlösung, pH 9,8, gestoppt. Die Extinktion des freigesetzten Nitrophenols, eines in alkalischem Medium gelben Farbstoffes, wurde bei 405 nm gemessen. Die quantitative Bestimmung der Farbstoffkonzentration erfolgte anhand einer Eichkurve, bei der bekannte Nitrophenolkonzentrationen im Boratpuffer gegen deren Extinktion bei 405 nm aufgetragen wurden.

2.9.5. ß-Mannosidase

Die ß-Mannosidase wird ebenfalls als Markerenzym für Vakuolen verwendet (BUSER-SUTER et al. 1982), es läßt sich im Gegensatz zur Sauren Phosphatase pelletieren, was für eine Bindung an Membranen spricht. Als Substrat wurde p-Nitrophenyl-ß-D-Mannopyranosid verwendet. Zu 200 µl 100 mM Citratpuffer, pH 4,8 plus 200 µl 10 mM pNM wurden 50 µl Probe zupipettiert. Die Inkubation dauerte 60 Minuten bei 30°C, das Stoppen und die Messung des freigesetzten Nitrophenols erfolgten wie unter 2.9.4. beschrieben.

2.9.6. Latente IDPase

Ein Marker für Golgi-Membranen ist die Latente IDPase (DAUWALDER et al. 1969; MORRÉ et al. 1977). Der latente Anteil kann durch Zugabe von Detergentien oder durch mehrtägiges Aufbewahren der Probe bei 4°C erzeugt werden (RAY et al. 1969). Im Versuch wurde die Latente IDPase aus der Differenz der Freisetzung von Phosphat mit und ohne Digitonin bestimmt. Hierzu wurden 470 ul eines Reaktionsgemisches, bestehend aus 2,5 mM IDP, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM $MgCl_2$ und 75 µg Digitonin, mit 30 µl Probe 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Abstoppen mit Reagens C und die photometrische Phosphatbestimmung erfolgten wie unter 2.8.2. beschrieben.

2.9.7. Glucansynthetasen I und II

Glucansynthetasen sind auf Membranen des Golgi-Apparates und des Plasmalemmas lokalisiert (RAY et al. 1969; Van der WOUDE et al. 1974). Wenn auch in neueren Arbeiten die Aussagen der oben genannten Autoren teilweise in Frage gestellt wurden (HENRY und STONE 1982; ROBINSON und GLAS 1983), so

läßt sich doch über Lokalisierung und Arbeitsweise dieser Enzyme folgendes aussagen:

Die GS I (UDPG-ß-1,4-Glucosyltransferase) ist ein Marker für Golgi-Membranen. Das Enzym besitzt eine hohe Affinität für UDPG und benötigt Mg^{2+}-Ionen.

Die GS II (UDPG-ß-1,3-Glucosyltransferase) ist an die Plasmamembran gebunden. Sie benötigt kein Mg^{2+}, verliert aber an Aktivität, wenn die Vorbehandlung in Mg-armen Medien stattgefunden hat (ROBINSON et al. 1982). Außerdem besitzt sie eine niedrige Affinität für UDPG.

Die Umsatzrate der Enzyme wurde ermittelt, indem der Einbau von ^{14}C-UDPG in alkoholunlösliches Material gemessen wurde. Dazu wurden 50 ul Probe zu 20 ul Reaktionsgemisch pipettiert, sodaß die Endkonzentrationen für die GS I-Messung 17 mM Tris-Acetat, pH 8, 1,65 µM ^{14}C-UDPG und 60 mM $MgCl_2$ betrugen; im GS II-Ansatz waren statt des $MgCl_2$ 0,48 mM nicht markiertes UDPG. Die Inkubationszeit betrug im Falle der GS I 5 Minuten, bei der GS II 10 Minuten, die Temperatur betrug jeweils 25°C.

Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 ml 70 % Ethanol gestoppt; die Proben wurden über Nacht bei 4°C aufbewahrt und danach viermal mit je 2 ml 70 % Ethanol durch Zentrifugieren (5 Minuten bei 1 000 x g) und Resuspendieren gewaschen. Das letzte Sediment wurde in 2 ml 100 % Ethanol aufgenommen und in 8 ml Scintillationsflüssigkeit (PPO-POPOP-Toluol) zur Bestimmung der Radioaktivität überführt.

3. Ergebnisse

3.1. Aufnahme von Indikatorfarbstoffen ins Vesikelinnere

Farbstoffe, welche zum Bestimmen von pH-Gradienten quer zu Membranen dienen, müssen folgende Eigenschaften besitzen:
- Verschiebung der absorbierenden Wellenlängen bei sich ändernden pH-Werten
- selektive Membranpermeabilität der nicht protonierten Form
- Ungiftigkeit und Fehlen von entkoppelnden Eigenschaften.

Die verwendeten Indikatoren Neutralrot, 9-Aminoacridin und Quinacrin erfüllen diese Forderungen: Sie alle sind schwache Basen und besitzen daher eine unprotonierte, ungeladene und eine protonierte, geladene Form (Abb. 2). Die Ladung wird hervorgerufen durch ein dissoziierbares Proton an einem der Ring-Stickstoffatome. Daraus ergibt sich auch deren selektive Membranpermeabilität: die unprotonierte, lipophile Form kann die Membran leicht passieren, während die geladene Form impermeabel ist. Beim Aufbau eines pH-Gradienten durch pH-Erniedrigung im Inneren von Membranvesikeln kommt es zu einem Nettoeinstrom und damit zur Akkumulation von protonierten Farbstoffmolekülen.

Der pH-Indikator Neutralrot wurde von mehreren Arbeitsgruppen verwendet (SIEFERMANN-HARMS 1978, HAGER et al. 1980, KAWAMURA und TAZAWA 1981). Wie HAGER und HELMLE (1981) zeigten, war die beste Bestimmungsmethode einer intravesikulären Ansäuerung die Absorptionsänderung bei der Wellenlänge 430 nm, was einer Abnahme des unprotonierten NR entsprach. Eine gleichzeitige Zunahme der protonierten Form bei 525 nm konnte nicht aufgezeichnet werden, weil NRH^+ mit negativ geladenen Membranbestandteilen in Wechselwirkung tritt und das Ergebnis verfälscht (PICK und AVRON 1976, HONG und JUNGE 1983).

Auch die Fluoreszenzfarbstoffe 9-Aminoacridin und Quinacrin werden seit einigen Jahren für pH-Messungen an pflanzlichen und tierischen Zellorganellen eingesetzt (z. B. Dell'ANTONE et al. 1978, LEE und FORTE 1978, HARAUX und KOUCHKOWSKY 1980).

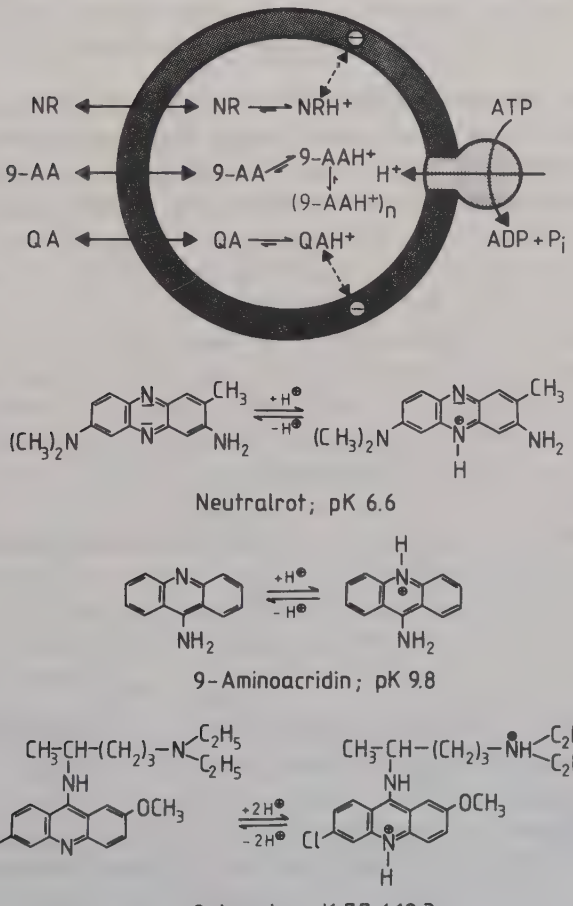

Abb. 2: Aufnahmemechanismus der Farbstoffe Neutralrot, 9-Aminoacridin und Quinacrin ins Vesikelinnere.

Dabei wurde die Tatsache ausgenutzt, daß freies H^+ innerhalb der Vesikel zu einem Löschen der Fluoreszenz führte, beim QA durch Protonierung des Farbstoffes, beim 9-AA wahrscheinlich durch Polymerenbildung (HUANG et al. 1983). Weil dem QA leicht entkoppelnde Wirkungen nachgesagt werden (LEE 1971), durfte die Konzentration dieses Farbstoffes nicht zu hoch gewählt werden. Bei der verwendeten Konzentration von 7,5 µM konnte kein entkoppelnder Effekt festgestellt werden.

Alle drei verwendeten Farbstoffe zeigten spezifische Vor- und Nachteile: So sollte beispielsweise die angezeigte Ansäuerung proportional zum eingesetzten Vesikelvolumen und damit auch zur Proteinmenge sein. Im Versuch, der in Abb. 3 wiedergege-

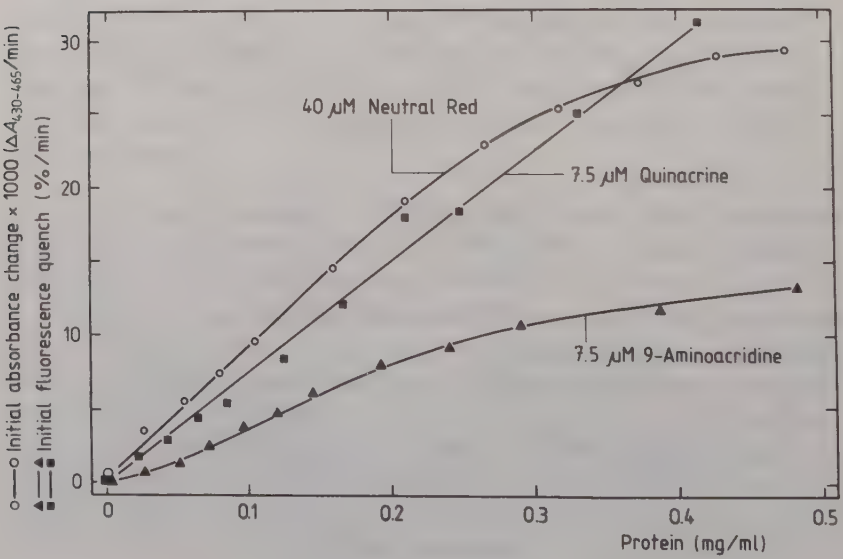

Abb. 3: Messung der intravesikulären Ansäuerungsraten durch verschiedene pH-Indikatoren in Abhängigkeit von der Konzentration des Membranproteins.

ben ist, wurden deshalb alle drei Farbstoffe mit unterschiedlichen Aliquots einer mikrosomalen Vesikelsuspension inkubiert und die Anfangssteigungen nach ATP-Zugabe gegen die Proteinkonzentrationen aufgetragen. Dabei zeigte sich, daß sich diese Steigungen bei Verwendung von Quinacrin bis über 0,4 mg Protein pro ml proportional zum Proteingehalt verhielten, daß die anderen Farbstoffe jedoch bei mehr als 0,3 mg Protein pro ml keine lineare Kurvensteigung mehr aufwiesen.

9-AA zeigte weitere Nachteile: Wie aus Abb. 24b und 25 zu entnehmen ist, führte die Zugabe von ATP zu einem Versatz im Fluoreszenzsignal, das abhängig war von der zugesetzten ATP-Konzentration. Dennoch brauchte eine durch ATP-Hydrolyse entstehende Verfälschung der Meßergebnisse nicht befürchtet zu werden, weil auch ADP- und AMP-Zugabe einen Versatz auslösten. Erschwerend kam beim 9-AA jedoch hinzu, daß hohe Lichtintensitäten im Fluorometer, aufgrund von photodynamischen Prozessen, z. B. Photooxidationen, zu einer Verminderung des Protonengradienten führten. Deshalb mußte die Intensität des anregenden Lichtes sehr niedrig gewählt werden, sodaß die Auflösungsgrenze des Photomultipliers fast erreicht war. Noch nicht geklärt ist die Tatsache, daß nach Zugabe des OH^-/Cl^--Austauschers Trimethylzinnchlorid (SELWYN et al. 1970) das Fluoreszenzsignal sich nicht nur bis zum Ausgangswert steigerte, sondern weit darüber hinaus (kein Schaubild). Bei den anderen Farbstoffen wurde dieser Effekt nicht festgestellt (siehe Abb. 26).

Ein Nachteil für die fluorometrische Bestimmung der Protonenaufnahme war die zur Verfügung stehende Suspensionsmenge. So betrug die Untergrenze für fluorometrische Messungen 1 ml Suspension. Bei der Verwendung von Neutralrot im Spektrophotometer reichten dagegen 0,5 ml Probe zur Messung aus. Deshalb konnte bei Proben, welche direkt aus dem Saccharosegradienten entnommen wurden, nur die Methode mit Neutralrot verwendet werden.

3.2. Zellfraktionierung

3.2.1. Verteilung der Organellen im Gleichgewichtsgradienten

Bei der gewählten Zusammensetzung der Medien (siehe 2.2. und 2.3.) wurden, wie Abb. 4 zeigt, in einem isopyknischen, linearen Saccharosegradienten von 15 bis 45 % (w/w) die einzelnen Vesikelpopulationen nach 15stündiger Zentrifugation am besten getrennt; eine Zentrifugationsdauer von 2 1/2 Stunden reichte jedenfalls für gute Trennungen nicht aus, selbst wenn die Beschleunigung von 110 000 auf 141 000 x g erhöht wurde (kein Schaubild). Im beschriebenen Gradienten sah die Membranverteilung folgendermaßen aus: Bei 18 % Saccharose bandeten intakte Vakuolen, was am Vorhandensein der im Lumen gelösten Sauren Phosphatase angezeigt wurde. Ein Teil der Tonoplastenmembranen zog sich jedoch weiter in den Gradienten hinein, weil die ß-Mannosidase, ein an die Tonoplastenmembran gebundenes Enzym (MATILE, pers. Mitt.), noch mit größeren Aktivitäten bei 25 bis 30 % Saccharose aufzufinden war.

Gerade der Teil des Gradienten zwischen 20 und 30 % Zucker beinhaltete mehrere Membranpopulationen; der Absorptionsscan bei 280 nm gab diese Region mit einer breiten, nicht auflösbaren Schulter wieder. Es handelte sich dabei um Bestandteile des Endoplasmatischen Retikulums, welches scharf bei 25 % Saccharose bandete, weil durch EDTA-Zugabe im Homogenisiermedium die Ribosomen vom rauhen ER entfernt wurden und so die CCR-haltigen Membranen eine einheitliche Dichte aufwiesen. Dazu teilweise überlappend folgte eine pigmentierte Zone mit einem Maximum bei 28 % Saccharose. Deren gelben Farbstoffe konnten, wie dies in Abb. 7 gezeigt wird, eindeutig als Carotinoide nachgewiesen werden. Bei diesen Membranen handelte es sich jedoch nicht um Chloroplastenbruchstücke, was in Abb. 6 gezeigt wird: Die Carotinoid- und Chlorophyllbanden ergrünter Koleoptilzellen lassen sich nicht im Saccharosegradienten zur Deckung bringen. Es ist deshalb möglich, diese gelben Membranen als Plastidenenvelope zu beschreiben, weil diese eine Dichte von 1,11 bis 1,12 g/cm^3 aufweisen (SIMON et al. 1984) und oft mit Carotinoiden

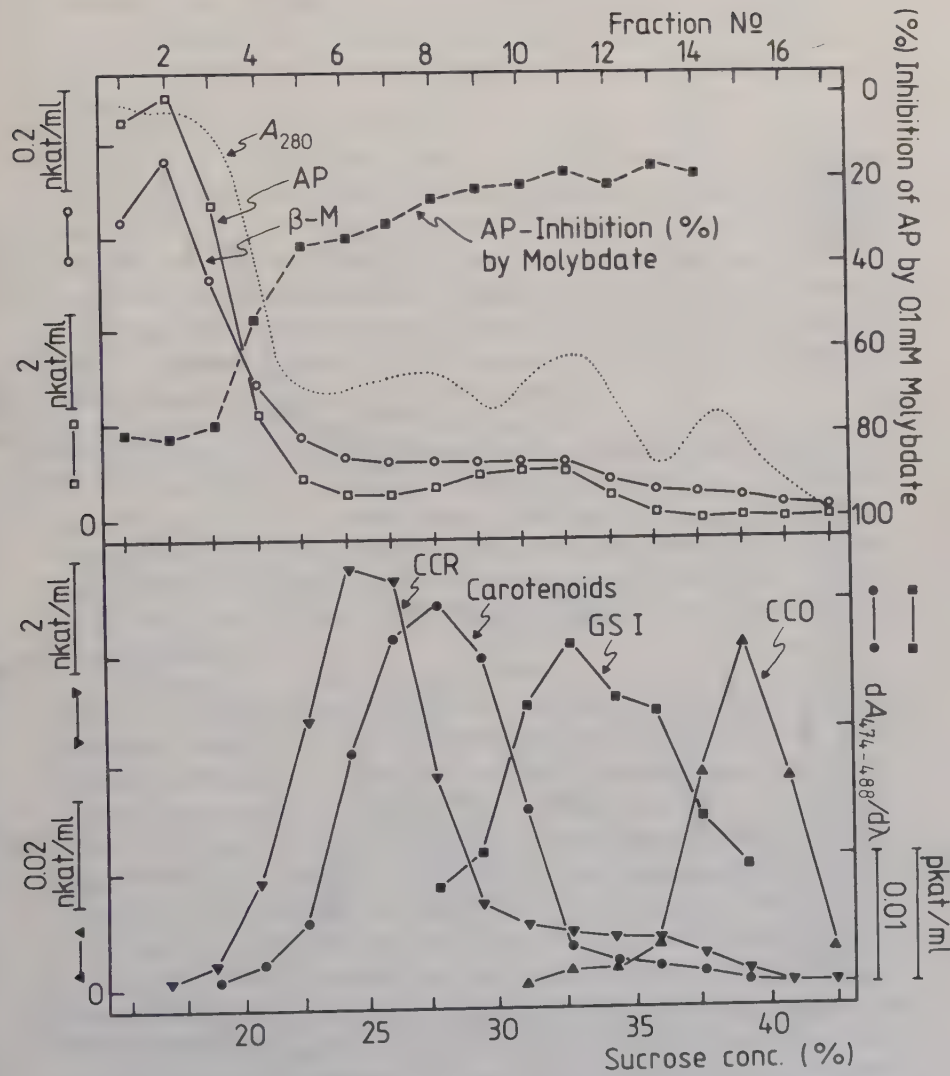

Abb. 4: Verteilung mikrosomaler Membranen aus Zellen von Maiskoleoptilen auf einem linearen, isopyknischen Saccharosegradienten. Eine 6 K-Überstandsfraktion wurde mit verschiedenen Markerenzymen charakterisiert.

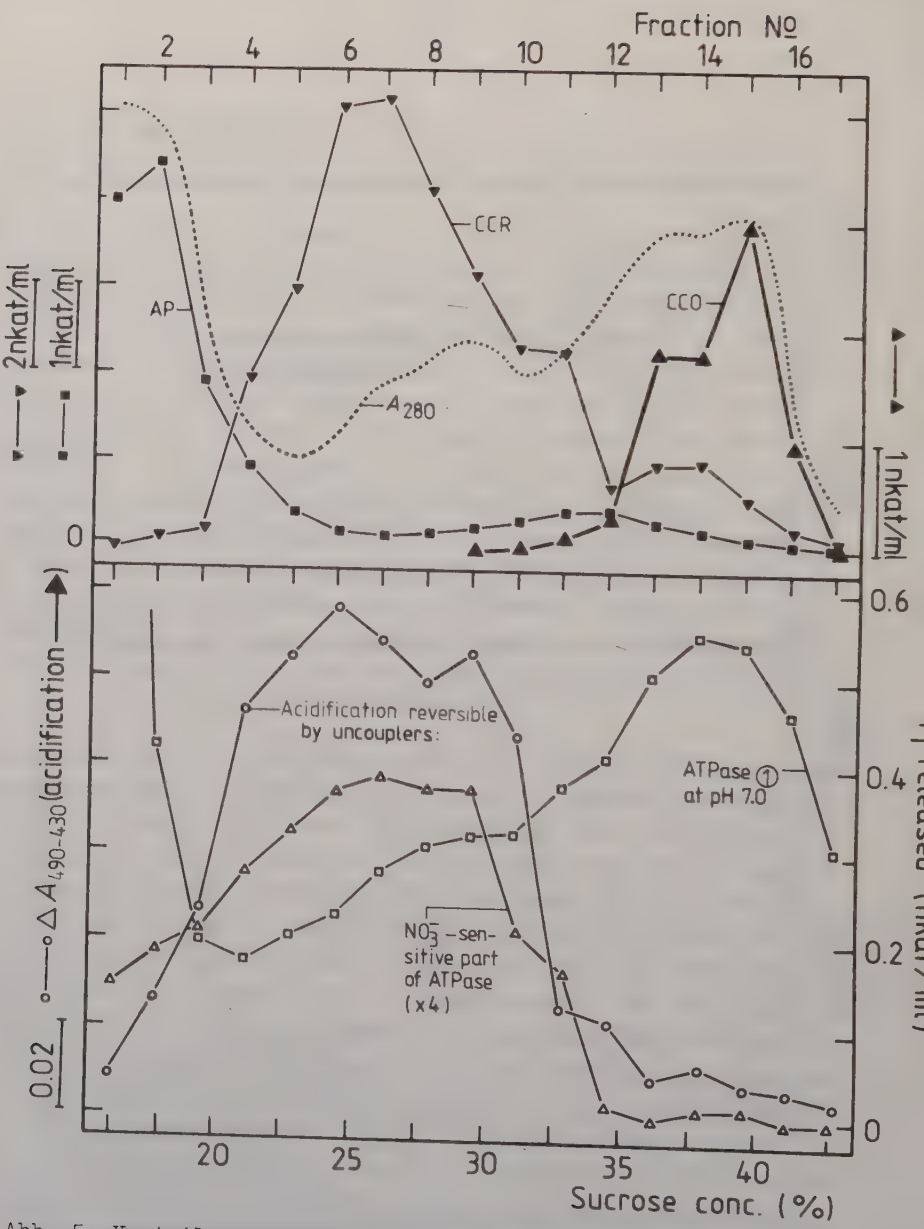

Abb. 5: Verteilung mikrosomaler Membranen aus Zellen von Haferkoleoptilen (Siegeshafer, Fa. Svalöv, Schweden; 6 Tage bei 24°C im Dunkeln gekeimt) auf einem linearen, isopyknischen Saccharosegradienten. Außer einigen Markerenzymen (oben) sind auch die nitratsensitive ATPase und die ATP-getriebene, chloridstimulierte Protonenpumpe bei pH 7,5 aufgetragen.

besetzt sind (DOUCE et al 1973, LICHTENTHALER et al. 1981). Eine weitergehende Charakterisierung mit Hilfe des Leitenzyms Galaktosyltransferase (DOUCE 1974) wurde nicht durchgeführt.

Bei etwa 32 % Saccharose bandete der Golgi-Apparat, zu erkennen an der GS I-Aktivität (Van der WOUDE et al. 1974). Außerdem trat bei dieser Dichte auch die Latente IDPase auf (Abb. 8); sie deckte sich mit der im AP-Test aufgetretenen membrangebundenen "Sauren Phosphatase", welche im Unterschied zum gleichnamigen Vakuolenenzym molybdatresistent war. Es ist denkbar, daß das Enzym im Golgi-Apparat außer IDP und anderen Nucleosiddiphosphaten auch pNP spalten kann.

Im schweren Teil des Dichtegradienten, bei etwa 38 % Saccharose, bandete ein Rest von Cytochrom-C-Oxidase. Es muß angenommen werden, daß dieses Enzym submitochondrialen Partikeln zuzuordnen ist, denn intakte Mitochondrien wurden bei der Vorzentrifugation fast quantitativ entfernt (NAGAHASHI und HIRAIKE 1982), sie weisen außerdem eine höhere Dichte auf (DAY und HANSON 1978).

Durch die Behandlung mit EDTA und EGTA ist die häufig als Plasmalemma-Marker verwendete Glucansynthetase II (RAY et al. 1969) inaktiv geworden, so daß die Lage der Plasmamenbran mit Hilfe dieses Markers nicht festgestellt werden konnte. Dennoch ließ sich über die K^+-stimulierte, vanadathemmbare ATPase, welche von HODGES und LEONARD (1974) als Plasmalemmamarker beschrieben wurde, deren Lage ablesen. Weil diese Autoren aber die K^+-stimulierte ATPase als Differenz der ATPase-Tätigkeit mit und ohne KCl definierten, andere Autoren aber, wie HENDRIX und PIERCE (1980) ATPasen beschrieben, bei denen das Anion die stimulierenden Eigenschaften besitzt, wurde die Differenz der ATPase-Tätigkeit zwischen KCl und einem anderen Chloridsalz, z. B. LiCl, als Maß für die K^+-Stimulation gewählt. Dieses Maximum mit einem nach geringeren Dichten hin langsamen Abfall, lag bei 39 % Saccharose (kein Schaubild). Ein Überlappen des

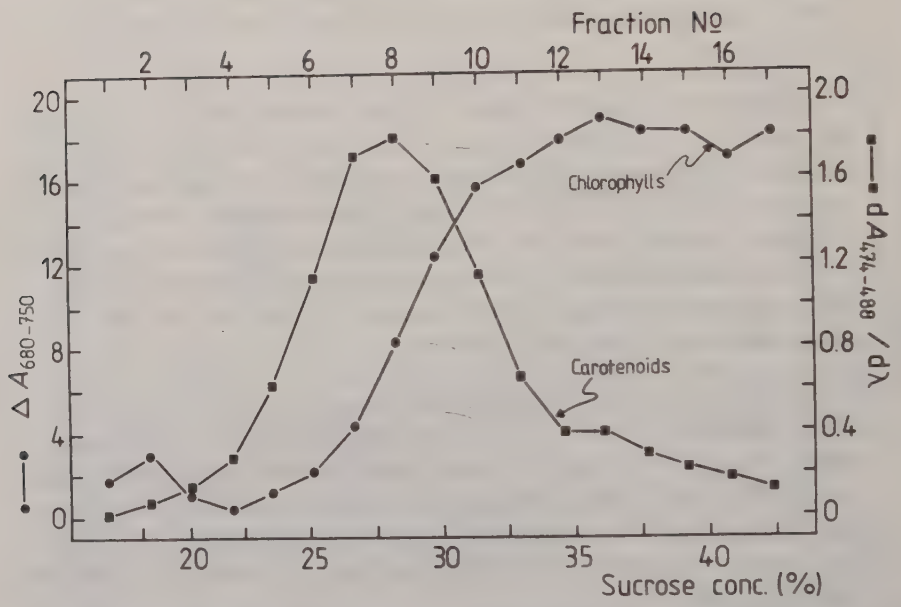

Abb. 6: Verteilung pigmentierter Membranen aus Zellen belichteter Maiskoleoptilen im linearen, isopyknischen Saccharosegradienten. Für die Carotinoidmessung wurden Maximum (474 nm) minus Minimum (488 nm) der ersten Ableitung des Absorptionsspektrums verwendet (siehe Abb. 7b).

Plasmalemmas brachte keine Komplikationen mit sich, weil die Verteilung beider Enzyme im Gradienten charakteristische Formen aufwies: Submitochondriale Partikel bandeten im Gegensatz zum Plasmalemma in einem sehr engen Bereich.

Zellen von Haferkoleoptilen zeigten grundsätzlich dieselbe Verteilung der Marker, allerdings sind, im Unterschied zum Mais, die Bestandteile mit hoher Dichte überproportional vorhanden (Abb. 5).

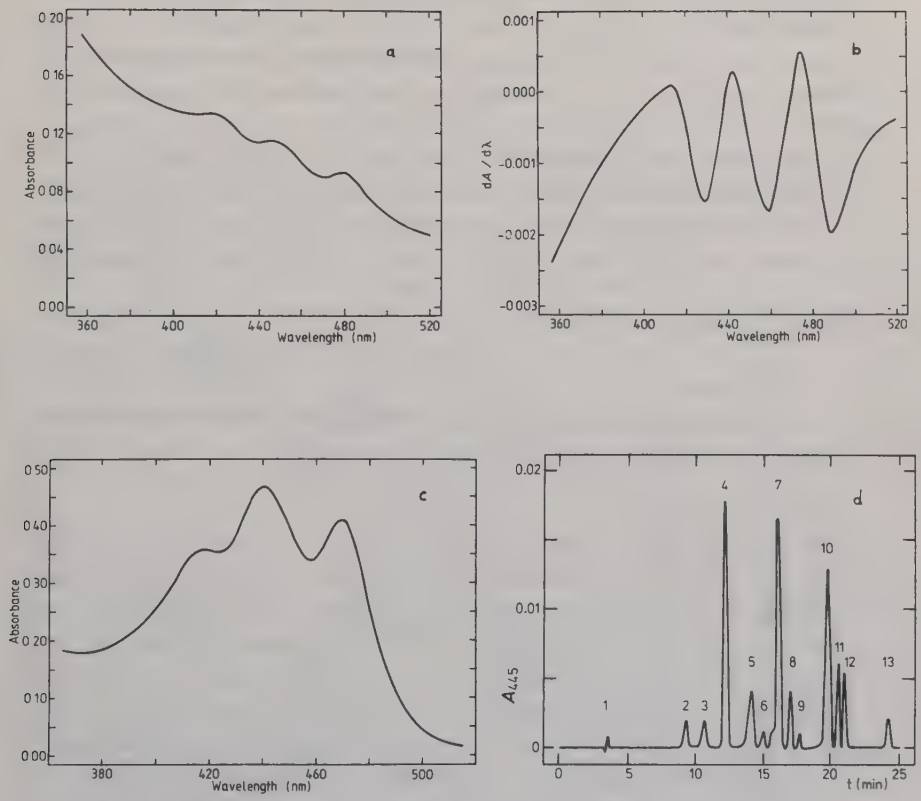

Abb. 7: Pigmentidentifizierung einer gelbgrün gefärbten Bande (Dichte 1,12 g/cm^3) des Saccharosegradienten.
(a) Spektrum der gefärbten Bande
(b) Erste Ableitung von Spektrum (a)
(c) angereicherter Pigmentextrakt in Ethanol
(d) Pigmentidentification durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie; Methode nach STRANSKY (unveröffentlicht). Folgende Pigmente wurden den jeweiligen Peaks zugeordnet: 2,3 = Neoxanthin; 4 = Violaxanthin; 5 = Antheraxanthin; 7 = Lutein plus Zeaxanthin; 13 = ß-Carotin.

3.2.2. Verteilung der ATPasen im Saccharosegradienten

Abb. 8 zeigt die Verteilung von ATPasen, gemessen bei den pH-Werten 6,5 und 7,5. Es war charakteristisch, daß in den Überstandsfraktionen des Gradienten hohe ATPase-Tätigkeit herrschte. Dies war zum Teil auf das Vorhandensein der Sauren Phosphatase zurückzuführen, welche aus zerbrochenen Vakuolen freigesetzt wurde; möglicherweise handelte es sich auch um Kopplungsfaktoren von ATPasen, welche durch die Behandlung mit EDTA von Membranen abgelöst worden waren. Ein Teil davon diffundierte während der 15 stündigen Zentrifugation in die obersten Schichten des Gradienten, sodaß die leichtesten Membranen

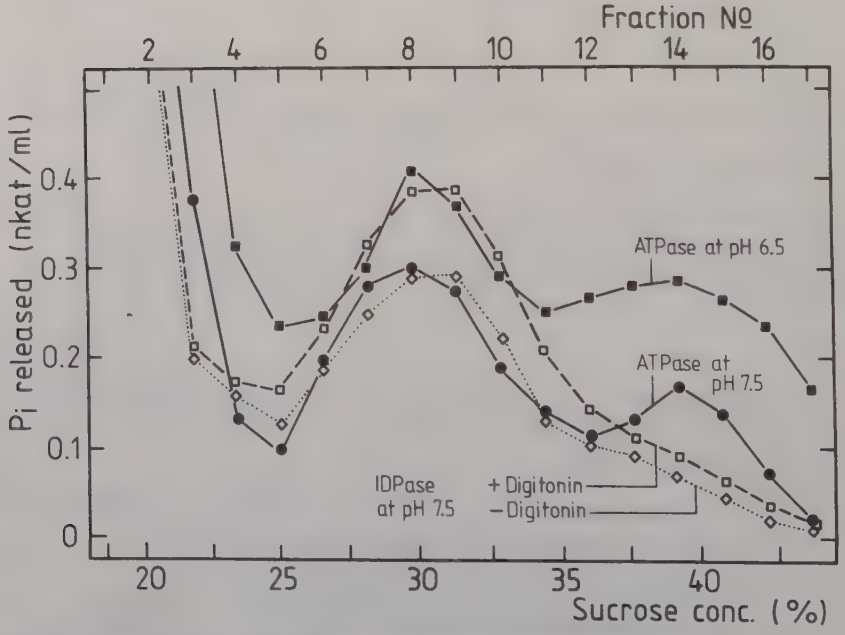

Abb. 8: Verteilung der gesamten ATPase-Aktivität bei den pH-Werten 6,5 und 7,5 sowie der IDPase-Aktivität bei pH 7,5 mit und ohne 0,15 mg/ml Digitonin im Saccharosegradienten. Die Substratkonzentration betrug 1 mM ATP bzw. 2,5 mM IDP.

mit diesem Fremdmaterial kontaminiert waren und die Auswertung dadurch erschwert wurde. Die Kontamination durch anorganisches Phosphat aus dem 6 K-Überstand erreichte ebenfalls die obersten Teile des Gradienten. Die ATPase-Tätigkeit in der leichtesten Gradientenfraktion, die sich aus diesen verschiedenartigen Komponenten zusammensetzte, durfte deshalb in den Ergebnissen nicht berücksichtigt werden.

Eine Unterscheidung der im Gradienten befindlichen ATPasen gelang durch Zugabe spezifischer Hemmstoffe. So ließ sich eine lösliche Saure Phosphatase durch Ammoniummolybdat hemmen (LEIGH und WALKER 1980); die mitochondriale ATPase wurde mit Azid oder Oligomycin inhibiert (Abb. 9). Nach Zusatz von 20 µM Oligomycin oder 500 µM Azid, sowie 50 µM Ammoniummolybdat blieb eine restliche ATPase übrig, die in den Schaubildern als ATPase ① bezeichnet wurde. Unter diesen Bedingungen verminderte sich die intravesikuläre Ansäuerung um weniger als 5 % (kein Schaubild). Für alle folgenden ATPase-Versuche wurden die genannten Inhibitoren zugesetzt.

Die ATPase ①-Aktivität an den verschiedenen Membranpopulationen unterteilte sich nun in drei Komponenten: eine Aktivität war einer leichten Membranfraktion zuzuordnen, welche zusammen mit der ß-Mannosidase bandete, also den Tonoplasten angehörte; sie war nitratsensitiv. Die zweite ATPase-Komponente bandete im mittleren Bereich, zum Teil überlappend mit der leichten Komponente; sie befand sich dort, wo auch die Glucansynthetase I-Aktivität festgestellt wurde; sie war also dictyosomalen Ursprungs. Eine dritte ATPase-Aktivität, welche durch Orthovanadat inhibiert werden konnte, bandete im schweren Bereich, sie war identisch mit der K^+-stimulierten ATPase. In Abb. 10 sind die drei Komponenten der ATPase ① dargestellt.

Beim Vergleich zwischen der Tonoplasten- und der Plasmalemma-ATPase (Abb. 8) fiel auf, daß letztere bei pH 7,5 kaum mehr Aktivität zeigte. Ein Vergleich der pH-abhängigen Leistung der

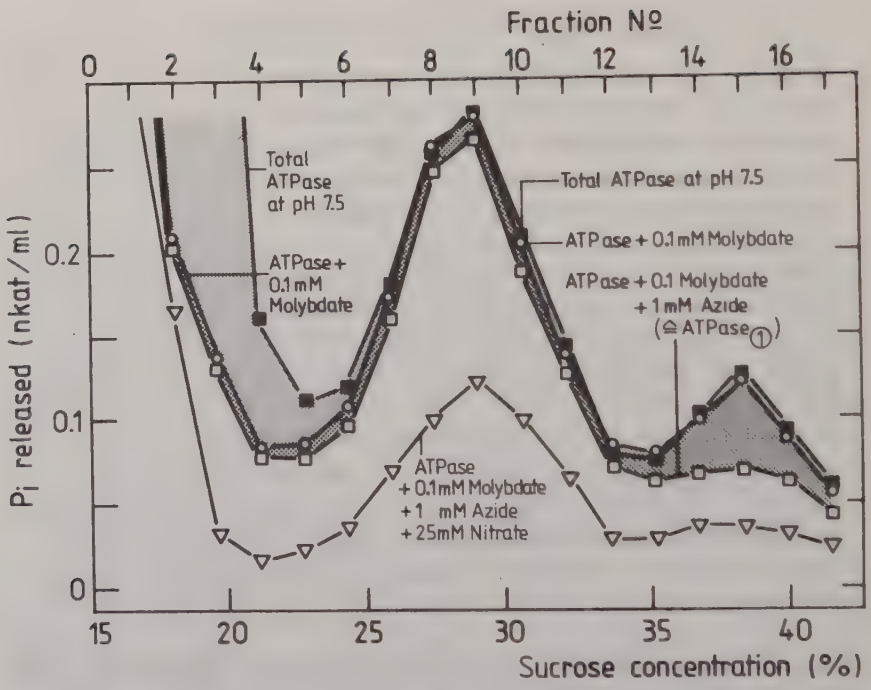

Abb. 9: Hemmung ATP-spaltender Enzyme durch spezifische Inhibitoren: Ammoniummolybdat hemmt die Saure Phosphatase, Azid die mitochondriale ATPase (bei 19 bzw. 38 % Saccharose). Andere ATPasen werden nicht beeinflußt, deshalb werden in den folgenden Versuchen beide Hemmstoffe zugegeben und die noch vorhandene ATPase mit ATPase ① bezeichnet. Diese beinhaltet die nitratsensitive ATPase der Tonoplasten, die Phosphatase des Golgi-Apparates (bei ca. 30 % Saccharose) und, bei pH 7,5 nur schwer erkennbar, die Plasmalemma-ATPase (bei 39 % Saccharose).

beiden Enzyme in Abb. 11 zeigte, daß die nitratsensitive ATPase bei pH 7,5 ein breites Optimum aufwies, das vanadatsensitive Enzym dagegen ein sehr schmales Optimum bei pH 6,5 hatte. Auf ähnliche pH-abhängige ATPase-Aktivitäten kamen auch O'NEILL et al.(1983), allerdings gaben diese Autoren die pH-Optima beider

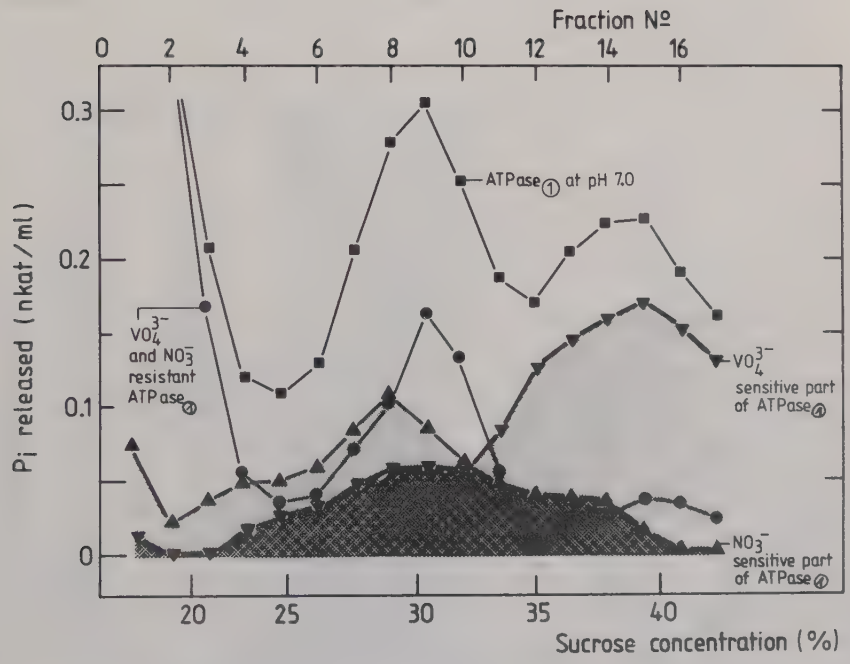

Abb. 10: Auftrennung der membrangebundenen ATPase ① - Aktivität: Bei 18 bzw. 28 % Saccharose ein nitrathemmbarer und bei 39 % ein vanadathemmbarer Anteil, dazu bei 31 % Saccharose eine nitrat- und vanadatresistente Komponente. Diese entsprechen der Tonoplasten- und der Plasmalemma-ATPase, sowie der Golgi-Phosphatase.

Enzyme, die an Maiswurzelvesikeln untersucht wurden, mit pH 6,5 an. Bei der K_m-Wert-Bestimmung, für die im Falle des Tonoplasten eine Gradientenfraktion von 27 % Saccharose in 10 mM HEPES, pH 7,5, und im Falle des Plasmalemmas eine Fraktion von 41 % Saccharose in 10 mM MOPS, pH 6,5 verwendet wurde, konnten je-

weils einfache Kinetiken ermittelt wurden. Der K_m-Wert betrug für die Tonoplasten-ATPase 0,28 mM ATP, für die Plasmalemma-ATPase 0,39 mM ATP.

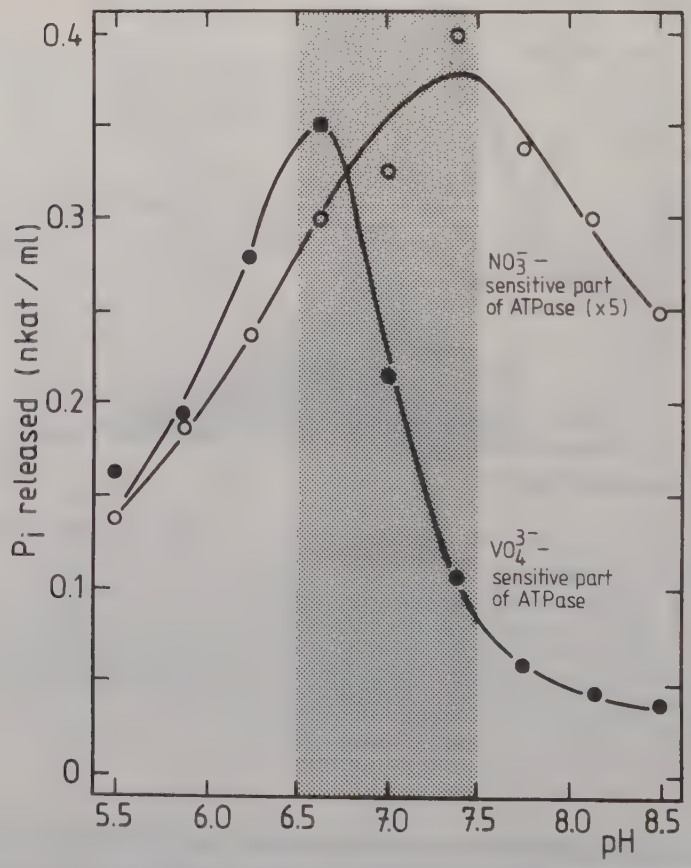

Abb. 11: pH-Abhängigkeiten der H^+-ATPasen von Plasmalemma (vanadatsensitiv) und Tonoplast (nitratsensitiv). Zur Bestimmung der Tonoplasten-ATPase wurde aus dem Dichtegradienten die 25 % - Saccharosebande verwendet, für die Plasmalemma-ATPase die 41 %-Bande. Es wurde jeweils die Differenz der Phosphat-Freisetzung mit und ohne 25 mM KNO_3 bzw. 0,5 mM K_3VO_4 aufgetragen.

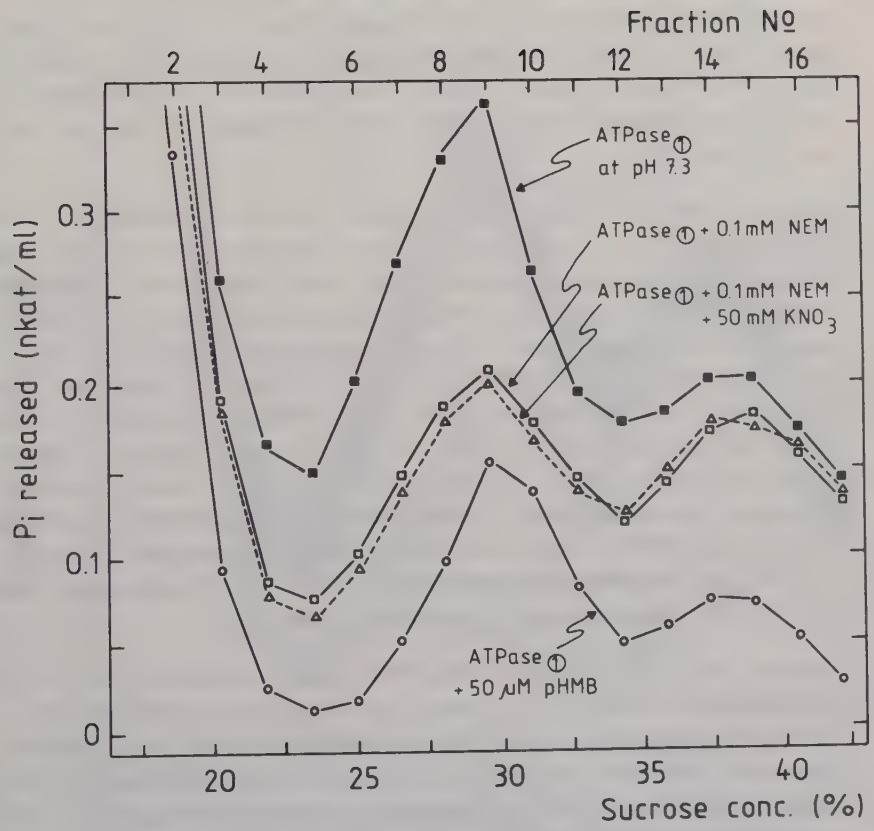

Abb. 12: Unterschiedliche Empfindlichkeiten der ATPasen auf die SH-Gruppengifte pHMB und NEM. Während 100 µM NEM fast ausschließlich die Tonoplasten-ATPase hemmten, wirkten 50 µM pHMB auch auf die Plasmalemma-ATPase hemmend. Die Golgi-Phosphatase erweist sich als resistent gegen die SH-Blocker. Für diesen Versuch wurden dem Homogenisier- und dem Gradientenmedium kein DTT beigemischt.

Unterschiedlich verhielten sich die ATPasen auch im Bezug auf ihre Empfindlichkeit gegenüber SH-Gruppen-Giften. Wie Abb. 12 verdeutlicht, hemmten 100 µM NEM die Tonoplasten-ATPase fast vollständig, während die Plasmalemma-ATPase und die Golgi-Phosphatase durch diese Hemmstoffkonzentrationen nicht wesentlich beeinflußt wurden. Auch hemmten 50 µM pHMB die Tonoplasten-ATPase vollständig, die anderen ATP-spaltenden Enzyme jedoch nur teilweise.

Soll die Fähigkeit der beschriebenen ATPasen, elektrogene Protonentransporte zu katalysieren, untersucht werden, so muß nach Zugabe von entkoppelnden Substanzen eine Steigerung der ATPase-Tätigkeit eintreten (SZE 1980). Dies war, wie Abb. 13 beweist, nur bei der Plasmalemma- und der Tonoplasten-ATPase der Fall; die Phosphatase des Golgi-Apparates (im Versuch wurde sie durch Hemmung der überlappenden Tonoplasten-ATPase durch Nitrat deutlich gemacht) hingegen zeigte sich z. B. durch Nigericin unbeeinflußt. Daß es sich bei der Golgi-Phosphatase nicht um eine Transport-ATPase handelt, entspricht den Ergebnissen von BRISKIN und POOLE (1983). Diese konnten eine pNPase-Aktivität mit KI leicht von der Membran lösen, die ATPase des Plasmalemmas blieb bei dieser Behandlung an die Membran gebunden.

Wurde nicht, wie dies bei den ATPase-Tests allgemein üblich ist, ein Proben-Aliquot in ein Reaktionsmedium ohne Osmotikum pipettiert, sondern in eines mit derselben Saccharosekonzentration wie die Probe selbst, so war die ATPase-Tätigkeit insbesonders im Bereich des Plasmalemmas stark erniedrigt (Abb. 14). Es konnte auch gezeigt werden, daß die ATPase-Aktivität im normalen Testansatz nach Zugabe von 0,5 mM Orthovanadat einen ähnlichen Kurvenverlauf zeigte, wie dies im beschriebenen Versuch der Fall war. Dies spricht dafür, daß die Plasmalemma-Vesikel möglicherweise inside-in vorliegen und erst durch einen osmotischen Schock teilweise umgedreht und somit für ATP zugänglich gemacht werden.

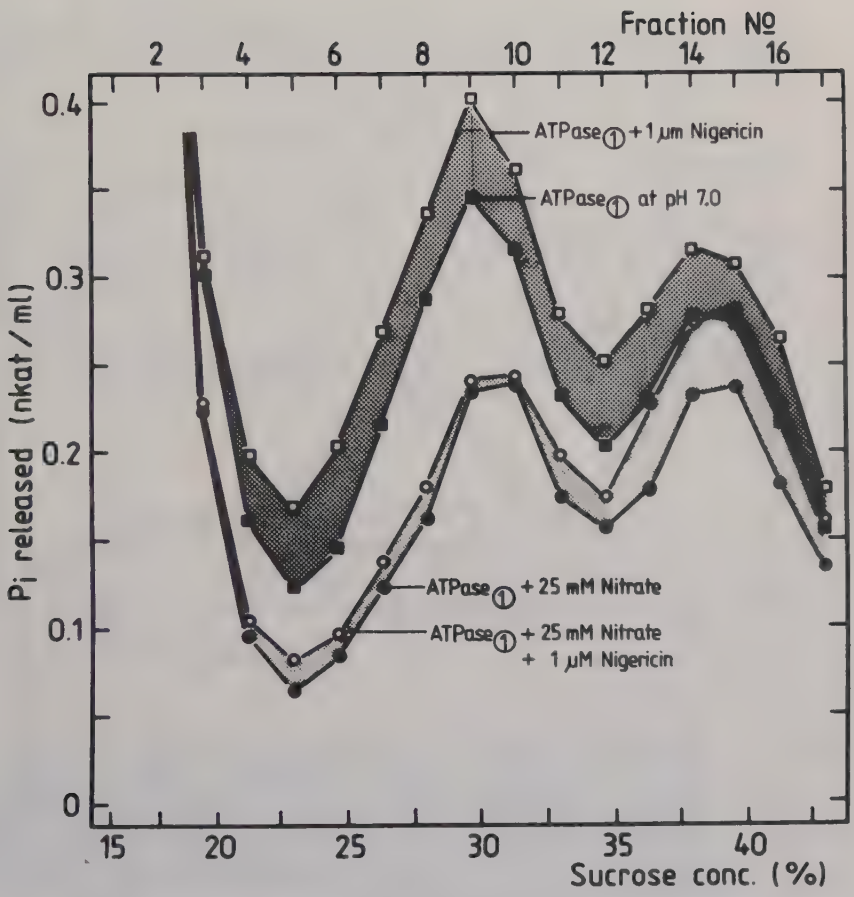

Abb. 13: Entkopplerstimulation der ATPase ① -Aktivität: Die ATP-Hydrolyse, die mit einem Protonentransport in die Vesikel gekoppelt ist, wird durch 1 µM Nigericin stimuliert. Dies ist hier nur der Fall in der leichten Tonoplasten- und in der schweren Plasmalemmafraktion.

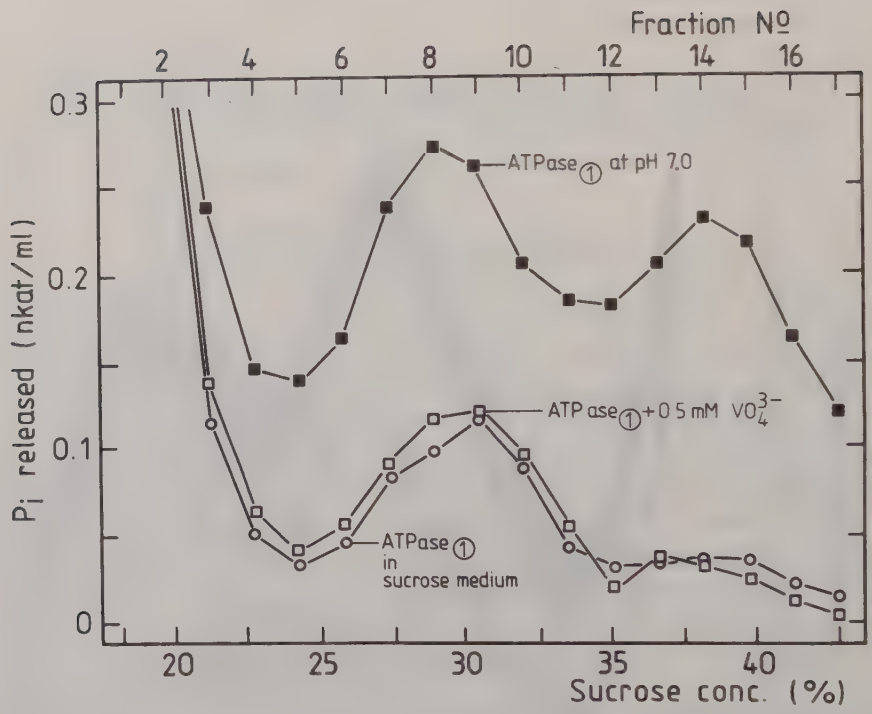

Abb. 14: ATPase ①-Tätigkeit im normalen Testansatz, sowie in einem modifizierten Test, bei dem der osmotische Schock, welcher üblicherweise durch die Verdünnung der Gradientenprobe entsteht, vermieden wurde. Im Bereich der Plasmalemmafraktion war nur eine sehr geringe ATPase-Tätigkeit nachzuweisen. Dies wurde durch das Kontrollexperiment, bei dem zum normalen Testansatz 0,5 mM Orthovanadat gegeben wurden, bestätigt.

3.2.3. Verteilung der Protonenpumpen im Saccharosegradienten

Bei einem Außen-pH-Wert von 7,5 wurden im Saccharosegradienten zwei Peaks für die ATP-getriebene Protonenpumpe (Abb. 21) festgestellt: einer bei 18 % und einer bei 28 % Saccharose. Beide hatten von Versuch zu Versuch unterschiedliche Intensitäten, jedoch galt die Faustregel, daß ein hoher Peak bei 18 % einen niedrigen bei 28 % ergab und umgekehrt. Deshalb mußte davon ausgegangen werden, daß beide Protonenpumpen derselben Vesikelpopulation angehörten. Auch im Bereich um 39 % Saccharose konnte ein H^+-Transport festgestellt werden (Abb. 31), jedoch nicht bei pH 7,5 wie in Abb. 21 und 22, sondern erst ab einem Außen-pH von 7,0. Die Intensität des Peaks war im allgemeinen so schwach, daß dieser nur unter bestimmten Bedingungen, die im nächsten Kapitel beschrieben sind, erkannt werden konnte.

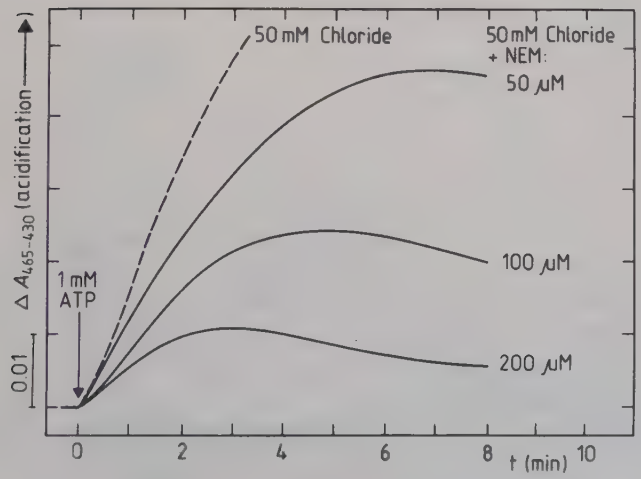

Abb. 15: Ansäuerungskinetiken an der Suspension eines mikrosomalen Pellets mit Außen-pH 7,5 (≙ Tonoplastenmembranen), unter Verwendung des SH-Gruppengiftes N-Ethylmaleimid.

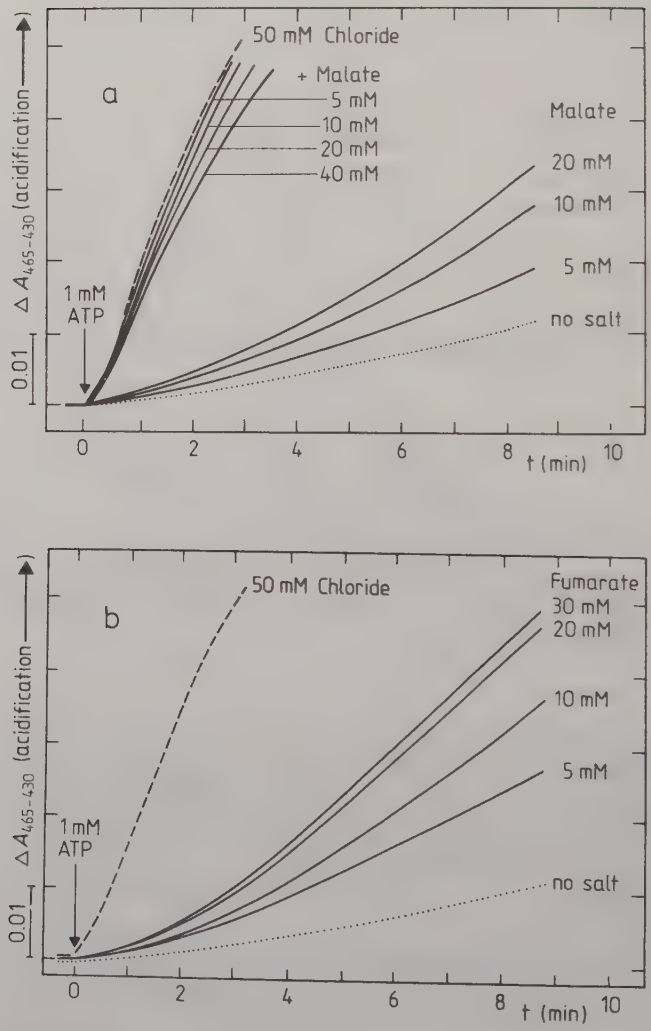

Abb. 16: ATP-abhängige Ansäuerung von Tonoplastenvesikeln in Anwesenheit von Chlorid, Malat und Chlorid plus Malat (a) , sowie von Chlorid und Fumarat (b).

3.3. Charakterisierung von Protonenpumpen

3.3.1. Anionenabhängige Protonenpumpen am Tonoplasten

HAGER und HELMLE (1981) hatten bereits festgestellt, daß die Mg:ATP-getriebene Protonenpumpe einer leichten Fraktion mikrosomaler Vesikel aus Maiskoleoptilen anionenabhängig war: Sie wurde durch Chlorid und Bromid stimuliert, durch Nitrat gehemmt und von Fluorid nicht beeinflußt. Diese Untersuchungen wurden fortgesetzt, allerdings nicht mit Hilfe von bestimmten Gradientenfraktionen, sondern aus einer Suspension eines mikrosomalen Pellets. Es konnte nämlich davon ausgegangen werden, daß bei einem Außen-pH von 7,5 nur die Protonenpumpe des Tonoplasten aktiv war; diese Protonenpumpe erwies sich außerdem, wie die dazugehörige ATPase, als sensitiv gegenüber den SH-Gruppen-Giften NEM (Abb. 15), pHMB (KRAUSS et al.1983) und 3-Methylenoxindol (KRAUSS et al.1984).

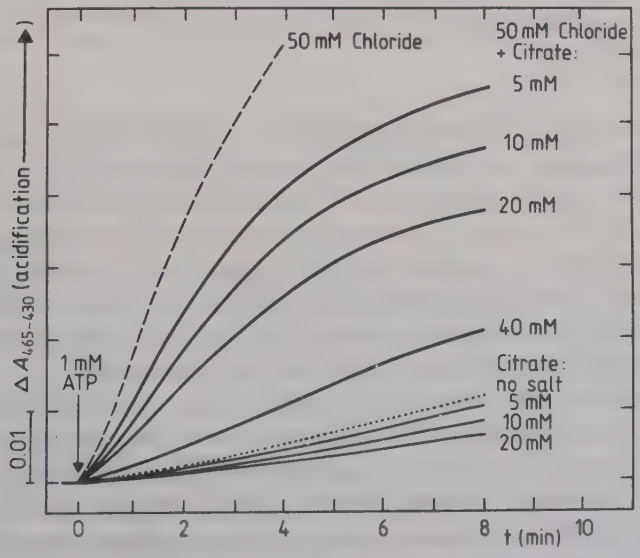

Abb. 17: Verminderung der chloridabhängigen Ansäuerung von Tonoplastenvesikeln bei Anwesenheit von Citrat.

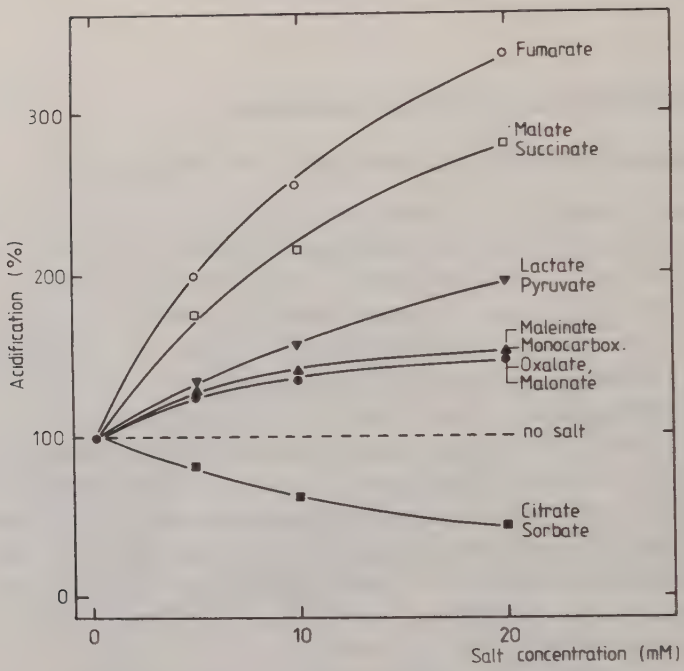

Abb. 18: ATP-getriebene, anionenabhängige intravesikuläre Ansäuerung von Tonoplastenvesikeln in Abhängigkeit von der Konzentration der eingesetzten organischen Anionen.

Durch Versuche, bei denen zeitabhängige Ansäuerungskinetiken verfolgt werden konnten, wurde gezeigt, daß auch organische Anionen die Protonenpumpe des Tonoplasten beeinflussen. C_4-Dicarboxylate zeigten in der Reihe Succinat < Oxalacetat < Malat < Tartrat < Fumarat eine Steigerung der ATP-abhängigen intravesikulären Ansäuerung (Abb. 16 und 18), auch α-Ketoglutarat und die Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure (D- und L-Konfigurationen) führten zur verstärkten Ansäuerung gegenüber der Kontrolle ohne Salze. Keine oder kaum Stimulation wurde nach Zugabe von Oxalat, Malonat und Maleinat festgestellt, wenig Stimulation wurde durch Glycolat, Lactat und Pyruvat erreicht; hemmend wirkten Citrat, Sorbat und Glyoxylat - im Falle des Citrats (Abb. 17) ist aufgrund der Pufferwirkung eine Verfälschung des Meßergebnisses nicht auszuschließen.

Kompetitionsexperimente zeigten, daß die chloridstimulierte Ansäuerung, deren Geschwindigkeit in sättigenden Konzentrationen (50 bis 75 mM Cl^-) etwa viermal so hoch war wie die fumaratstimulierte (Sättigung ca. 30 mM Fumarat), im Sättigungsbereich dann leicht vermindert war, wenn zusätzlich noch Fumarat zugegeben wurde. Im anderen Fall, wenn die Reaktion durch Fumarat gestartet wurde, führte die Chloridzugabe zu einer Erhöhung der ursprünglichen Ansäuerungsgeschwindigkeit (Abb. 19). Wenn Chlorid dagegen in nicht sättigender Konzentration eingesetzt wurde, dann war die Zugabe des C_4-Dicarboxylates in jedem Fall mit einer Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit verbunden (Abb. 20).

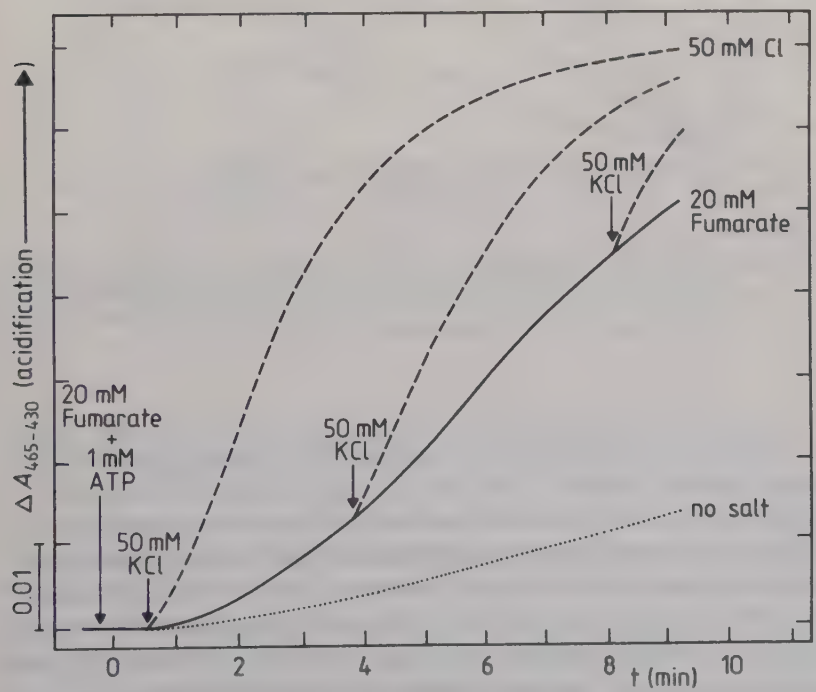

Abb. 19: Steigerung der fumaratinduzierten Ansäuerungsgeschwindigkeit nach Zugabe von Chlorid. Für die Geschwindigkeit ist der Zeitpunkt dieser Zugabe unbedeutend.

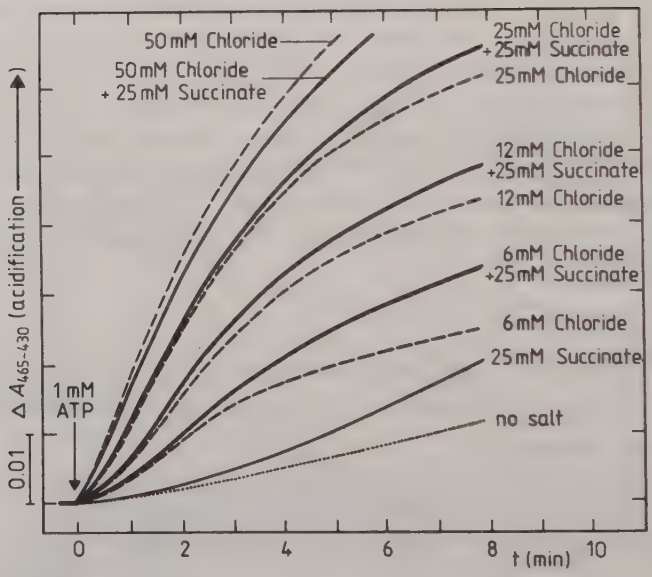

Abb. 20: Ansäuerungskinetiken bei Anwesenheit von Chlorid, Succinat und Chlorid plus Succinat. Im Bereich geringer Chloridkonzentrationen wirken Chlorid plus Succinat additiv, bei hohen Chloridkonzentrationen nicht mehr.

Die Zugabe von Anionen hatte nicht nur Auswirkungen auf die Ansäuerungsraten, sondern auch auf das Potential im Innern der Membranvesikel. Wie Versuche mit ANS, einem Fluoreszenzfarbstoff, mit welchem Potentialdifferenzen quer zu Membranen meßbar sind (SONE et al. 1976; Wellenlängen 380 → 475 nm; Tris-HCl-Puffer!), ergaben, wurde ein durch ATP aufgebautes Membranpotential (innen positiv) nach Zugabe von Chlorid schnell, nach Zugabe von Fumarat langsam erniedrigt (kein Schaubild).

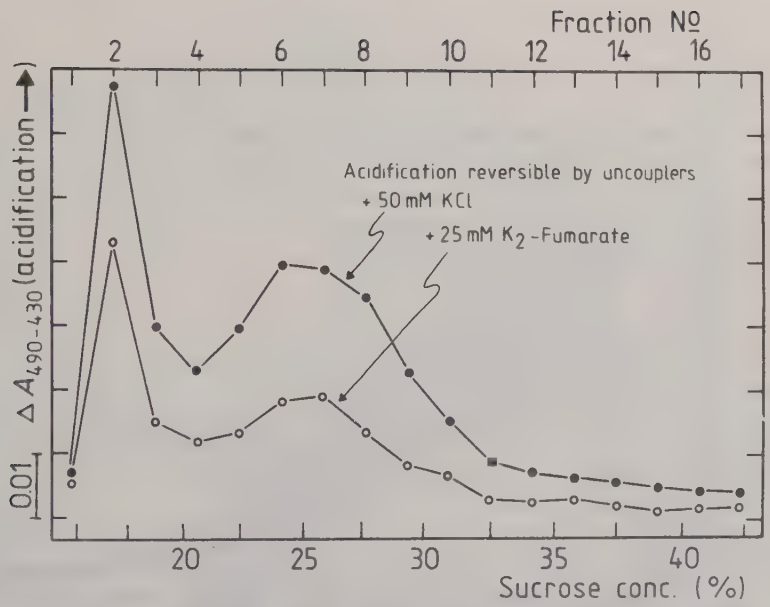

Abb. 21: Verteilung von Membranvesikeln im Dichtegradienten, welche eine ATP-abhängige intravesikuläre Ansäuerung bei Anwesenheit von Chlorid bzw. Fumarat zeigen, und die durch Entkoppler, wie 0,5 µM Nigericin, revertierbar ist. Die Reaktionszeit nach Zugabe von 2 mM Mg:ATP betrug im Versuch mit KCl 8 Minuten, mit K_2Fumarat 10 Minuten.

3.3.2. Beeinflussung der intravesikulären Ansäuerung durch Kationen

Die Ansäuerung im Inneren von Tonoplastenvesikeln konnte außer durch Anionen auch durch Kationen beeinflußt werden. Dieser Kationeneffekt war am besten zu sehen, wenn entweder die ATP-Konzentration auf Werte um den K_m herum erniedrigt wurde (Abb. 23) oder der Außen-pH leicht alkalisch war (Abb. 24); bei hohen ATP-Konzentrationen oder neutralem pH konnte der Kationeneffekt nur schwach registriert werden.

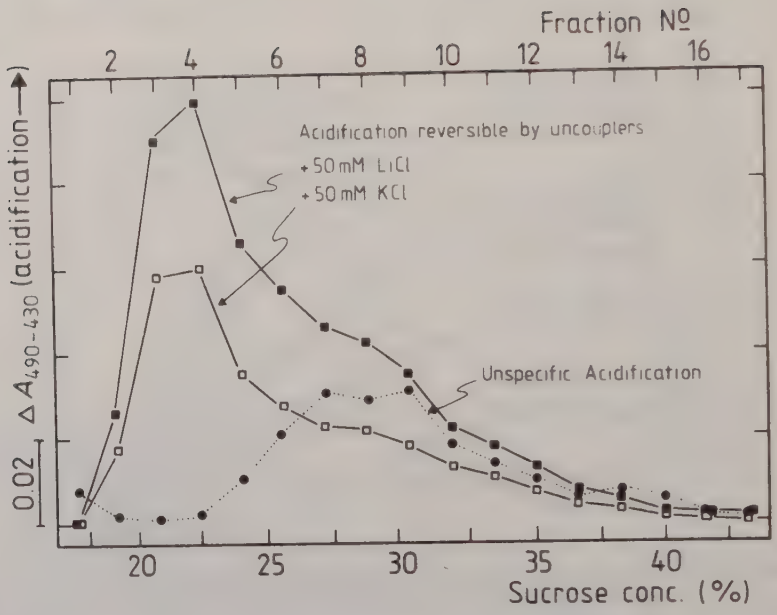

Abb. 22: Verteilung von mikrosomalen Vesikeln, welche bei einem Außen-pH von 7,5 eine ATP-getriebene, chloridabhängige intravesikuläre Ansäuerung zeigen. Die Absorptionsänderung des Neutralrot wurde nach 8 Minuten ATP-Inkubation, sowie 4 Minuten nach der darauffolgenden Zugabe von 5 µg Gramicidin gemessen; die Differenz wurde aufgezeichnet. Die "unspezifische Ansäuerung" stellt eine pH-Änderung im Medium dar, sie ist deshalb mit Entkopplern nicht zu revertieren, sie ist mit der Lage der Phosphatase der Golgi-Vesikel identisch. Die geringere Protonenakkumulation in den Vesikeln in Anwesenheit von K^+ (verglichen mit Li^+) ist die Folge eines H^+/K^+-Austausches an der Membran (siehe Abb. 33).

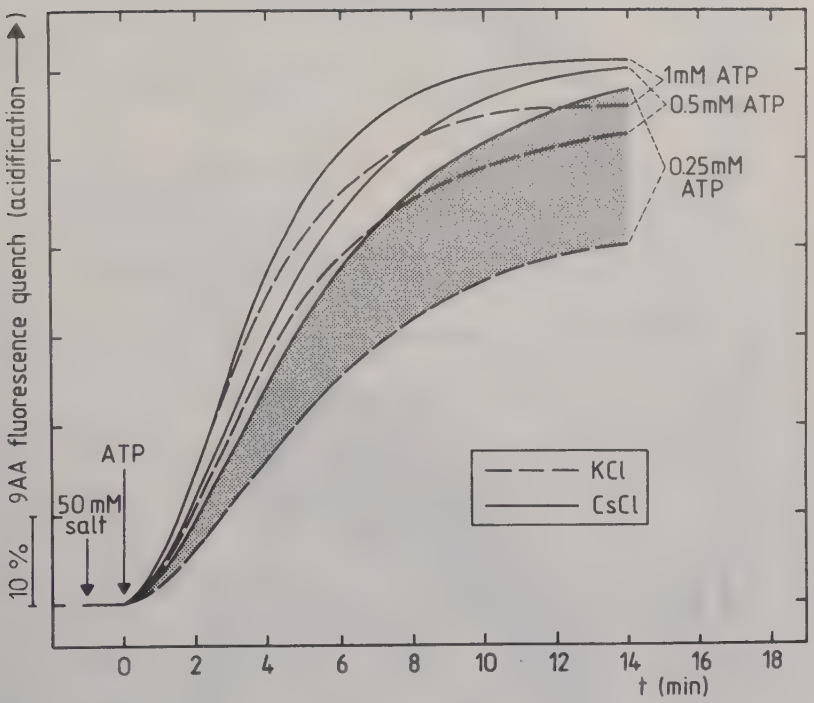

Abb. 23: Verstärkung der kationenabhängigen Ansäuerungsdifferenz durch Reduktion der ATP-Konzentration.

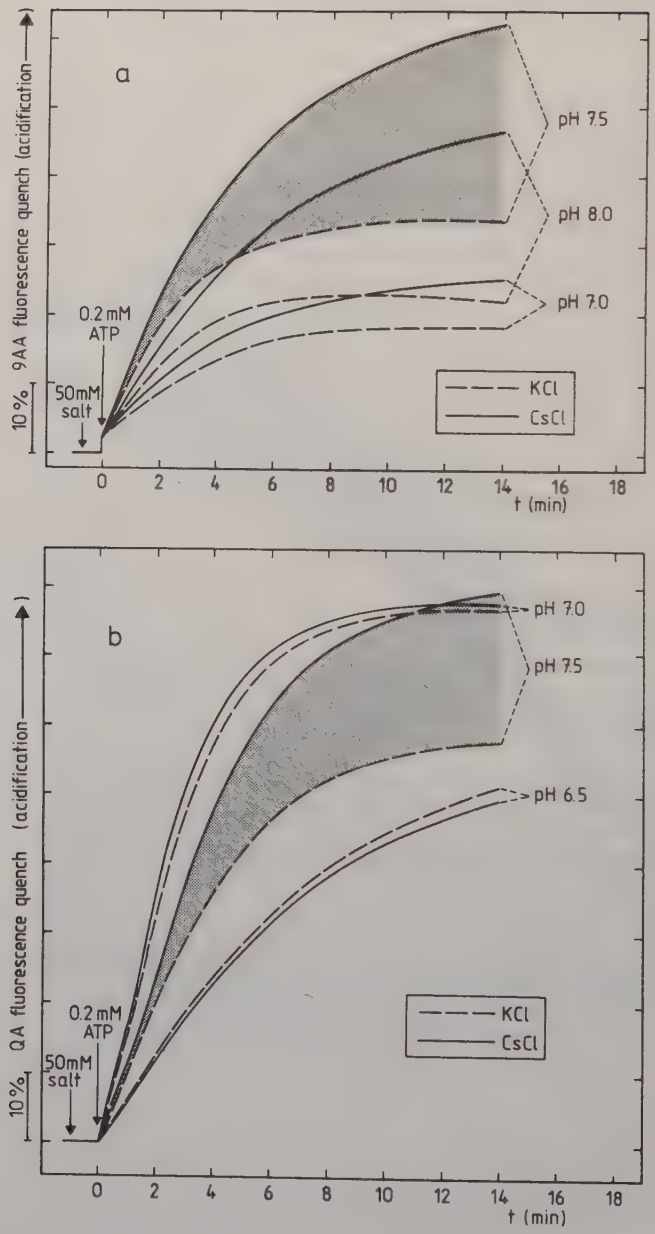

Abb. 24: Änderungen der kationeninduzierten Ansäuerungsdifferenzen unter Anwendung verschiedener pH-Werte. - Man beachte die unterschiedlichen Anzeigen der beiden Farbstoffe QA (a) und 9-AA (b).

Die Reihenfolge der Stimulation der Ansäuerung war, wie Abb. 25 zeigt, $K^+ < Na^+ < Rb^+ < Tris^+ < Cs^+ < Li^+ < Cholin^+$, wobei in diesem Experiment jeweils 50 mM des zu testenden Kations als Chloridsalz zugegeben wurden. Die kationenabhängige Ansäuerung war jedoch nicht auf das Vorhandensein eines bestimmten Anions beschränkt, im Versuch, der in Abb. 26 dargestellt ist, konnte auch α-Ketoglutarat anstelle des Chlorids eingesetzt werden.

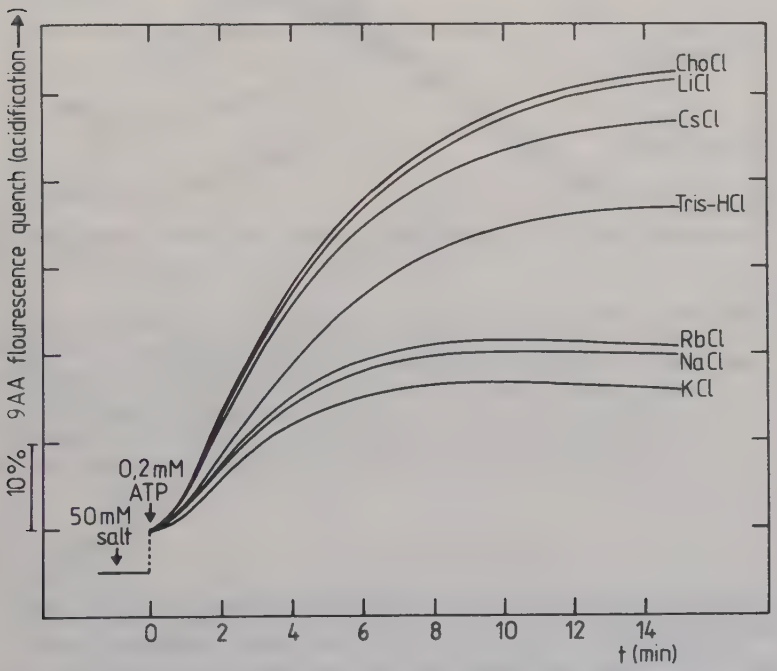

Abb. 25: Intravesikuläre Ansäuerung bei Verwendung von Chloridsalzen verschiedener einwertiger Kationen. K^+ führt zur scheinbar stärksten Hemmung des H^+-Influxes.

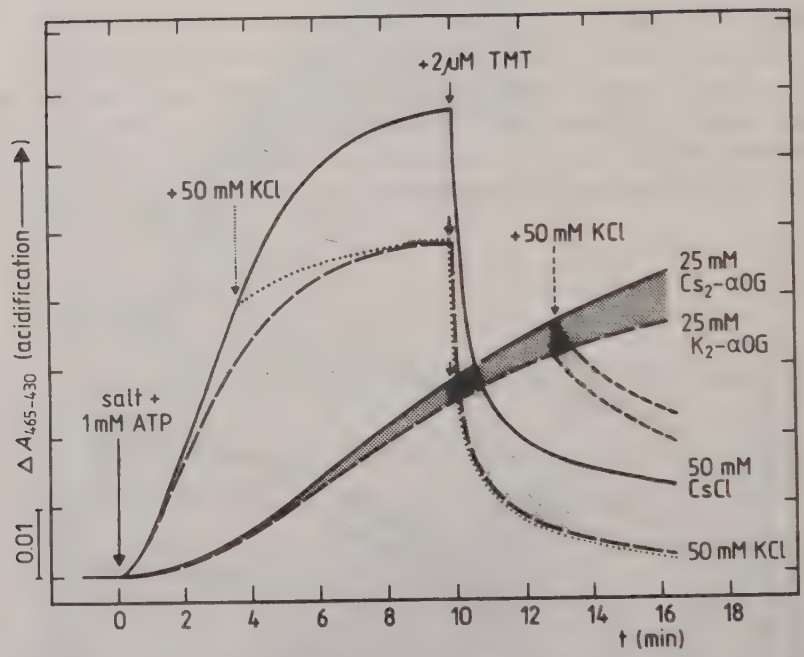

Abb. 26: Die kationenabhängige Ansäuerung mikrosomaler Vesikel ist nicht auf das Anion Chlorid beschränkt, sie kann auch mit α-Ketoglutarat erfolgen. Ein Protonen-Efflux nach Zugabe des Cl^-/OH^--Austauschers Trimethylzinnchlorid ist nur bei den Chlorid enthaltenden Vesikeln zu beobachten. Bei den α-Ketoglutarat enthaltenden Vesikeln erfolgt ein H^+-Efflux erst nach Zugabe von KCl.

Im Saccharosegradienten war die kationenabhängige Ansäuerung im selben Bereich wie die anionenstimulierte verteilt (Abb. 21 und 22), sodaß in diesen Fällen nur Tonoplastenvesikel in Frage kommen konnten; es gab allerdings auch, wie Abb. 31 zeigt, am Plasmalemma ähnliche kationenabhängige Ansäuerungsraten. Während aber die anionenabhängige Protonenpump-Tätigkeit eine Erhöhung der ATPase-Aktivität mit sich brachte

(Abb. 27), konnte dies bei der kationenabhängigen am Tonoplasten nicht nachgewiesen werden (Abb. 28); am Plasmalemma wurde gar ein entgegengesetzter Effekt beobachtet: Trotz Verringerung des Nettoprotonentransportes in Anwesenheit von Li^+ oder Cs^+ war eine Verstärkung der ATPase-Aktivität festzustellen (kein Schaubild). Ähnliche Befunde wurden auch von SZE (1983) beschrieben.

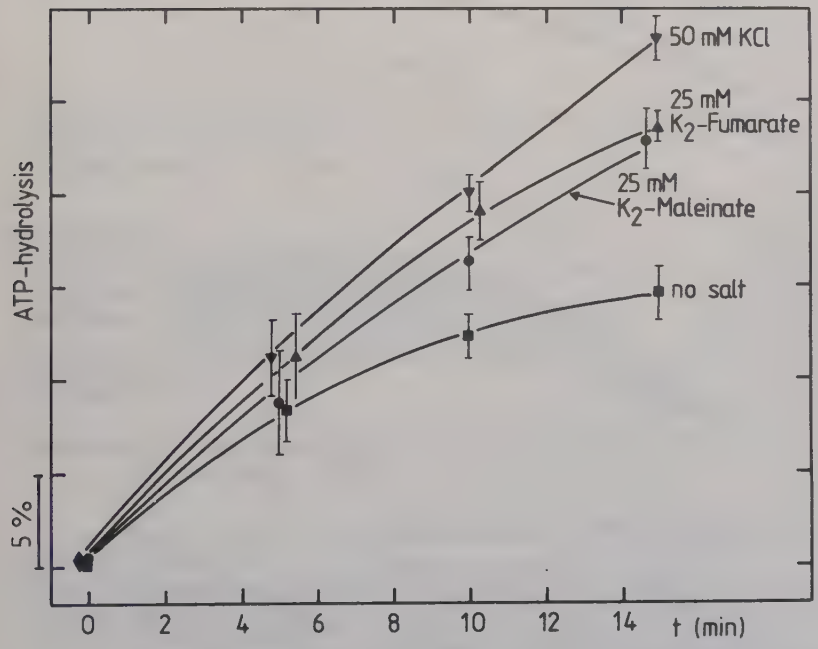

Abb. 27: ATPase-Tätigkeit einer mikrosomalen Fraktion mit Außen-pH 7,5 bei Anwesenheit verschiedener Anionen. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von ATP (1 mM EK). Die anioneninduzierte Steigerung der ATP-Hydrolyse entsprach der anionenabhängigen Protonenpumpaktivität.

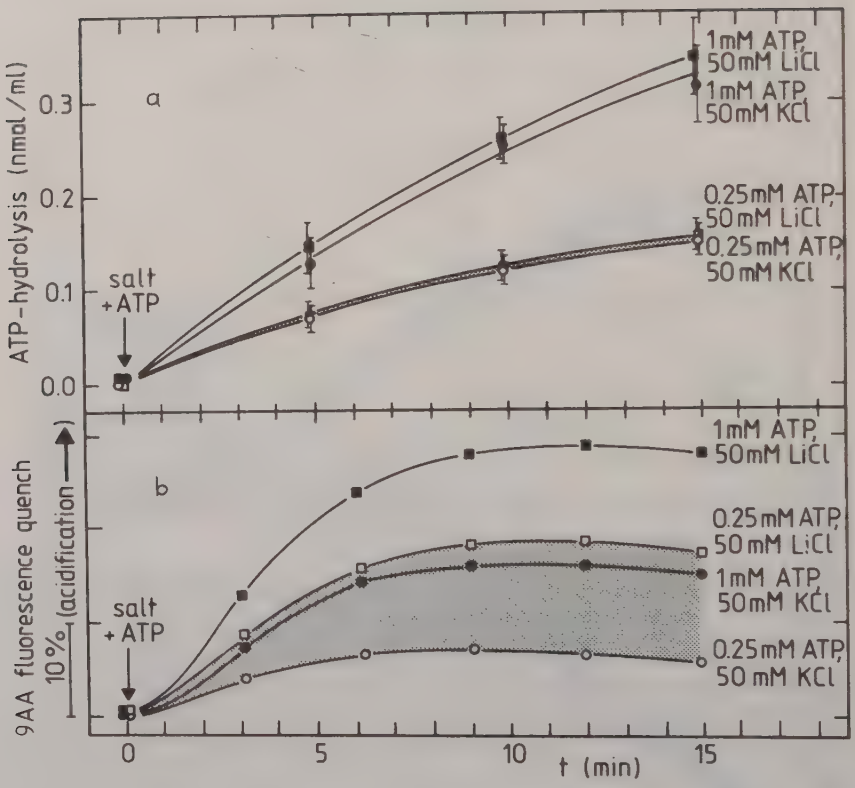

Abb. 28: Vergleich der ATPase-Aktivität (a) mit dem ATP-getriebenen Protonentransport (b) in Anwesenheit verschiedener Kationen. Der Nettoprotonentransport ist in Anwesenheit von K^+ im Vergleich zu Li^+ verringert, während die ATPase bei pH 7,5 unempfindlich auf verschiedene Kationen reagiert.

Eine K_m-Wert-Bestimmung (Abb. 29) zeigte, daß eine direkte Beeinflussung der Pumpe durch Kationen ausgeschlossen werden konnte: Es trat keine kationeninduzierte Änderung des K_m-Wertes von 0,24 mM ATP ein; die unterschiedlichen Ansäuerungsraten entsprangen aus der Änderung der Maximalgeschwindigkeit. Die Kationenabhängigkeit der Ansäuerung entstand also infolge eines sekundären Prozesses.

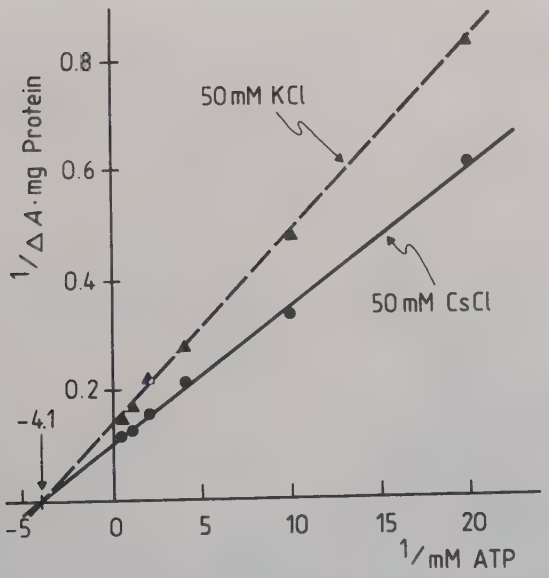

Abb. 29: Lineweaver-Burk-Diagramm der ATP-abhängigen intravesikulären Ansäuerung von Tonoplastenvesikeln bei Anwesenheit von KCl bzw. CsCl in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration; als Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit wurde die Änderung der Absorptionsdifferenz (ΔA) von Neutralrot ($A \triangleq 430$ nm - 465 nm in mOD) pro Minute angegeben. Die beiden Kationen beeinflußten die Affinität der H^+-ATPase für ATP nicht; der K_m-Wert lag jeweils bei 0,24 mM ATP.

Eine Klärung dieses Effektes wurde durch den in Abb. 30 beschriebenen Versuch erbracht: Die nach Hemmung der Protonenpumpe durch 0,1 mM DCCD gemessenen H^+-Effluxe waren in Anwesenheit von K^+ am größten, sie verringerten sich in derselben Reihenfolge, wie dies für die Stimulation der Protonenakkumulation durch Kationen beschrieben wurde. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte angenommen werden, daß, wie es von SZE (1983) postuliert worden war, ein K^+/H^+-Antiporter an der Vesikelmembran lokalisiert war. Dabei hätte die K^+-Aufnahme, welche direkt mit der H^+-Abgabe gekoppelt wäre, mit Hilfe der Flammen-

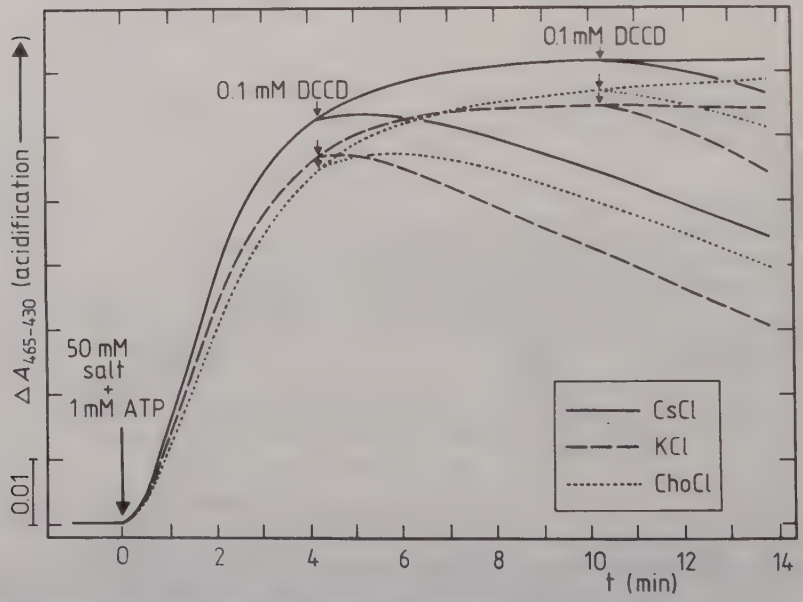

Abb. 30: ATP- und Cl^--abhängige intravesikuläre Ansäuerung von Tonoplastenvesikeln bei Anwesenheit der Kationen K^+, Cs^+ und Cholin$^+$. Hemmung der Protonenpumpe durch DCCD führt zu einem Protonenausstrom, der in Gegenwart von K^+ am größten ist. Dieses und die in Abb. 22 bis 29 dargestellten Ergebnisse deuten auf die Existenz eines H^+/K^+-Austauschcarriers hin.

emissionsspektroskopie nachgewiesen werden können. Die nach der Methode unter 2.6. beschriebene Aufarbeitung der Vesikel ließ jedoch exakte Messungen nicht zu, sodaß der Nachweis der K^+-Aufnahme, wie er bei SZE und HODGES (1977), sowie LUNDBORG et al. (1983) an Gewebestücken erbracht wurde, sich an mikrosomalen Vesikeln nicht nachvollziehen ließ (kein Schaubild).

3.3.3. Charakterisierung von Protonenpumpen am Plasmalemma

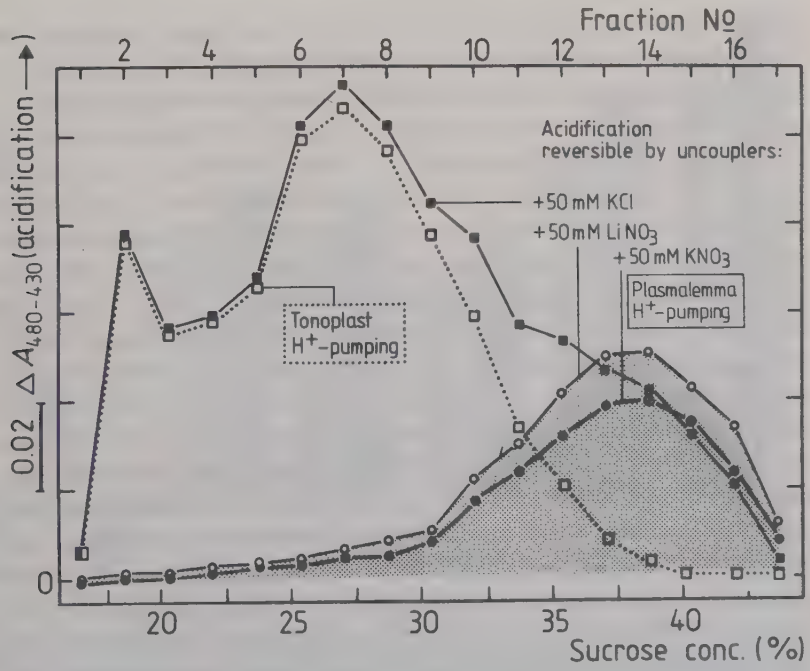

Abb. 31: Verteilung der nitratsensitiven Protonenpumpe des Plasmalemmas im Vergleich zur nitratresistenten H^+-Pumpe der Tonoplastenmembran im Saccharosegradienten. Auch am Plasmalemma ist die Nettoansäuerung kationenabhängig. In diesem Versuch betrug die Reaktionszeit 14 Minuten, der Außen-pH 7,0.

Im Vergleich zur Protonenakkumulation in Tonoplastenvesikeln konnte ein durch Entkoppler revertierbarer, ATP-abhängiger Protoneneinstrom an Plasmalemma-Vesikeln nur undeutlich beobachtet werden. Die meßbare Ansäuerung war, obwohl die ATPase-Tätigkeit hier stärker war als an der Tonoplastenmembran (Abb. 10), deutlich geringer als bei den Vakuolenvesikeln (Abb . 31).

Zur näheren Charakterisierung der Plasmalemma-Pumpe konnten deshalb nur gereinigte Membranen verwendet werden, daher wurde in diesen Versuchen jeweils eine 41 %-Fraktion aus einem isopyknischen Saccharosegradienten entnommen.

Hiermit konnten deutliche Unterschiede zwischen Tonoplast und Plasmalemma herausgearbeitet werden: Während ATPase- und Protonenpump-Aktivität am Tonoplasten streng anionenspezifisch sind (BENNETT und SPANSWICK 1983), und eine Nitrathemmbarkeit sowohl der ATPase (O'NEILL et al. 1983) als auch der Protonenpumpe (HAGER und HELMLE 1981) nachgewiesen wurde, war am Plasmalemma ein großer Teil der intravesikulären Protonenakkumulation nicht auf das Vorhandensein bestimmter Anionen zurückzuführen, eine Diskriminierung zwischen Chlorid und Nitrat trat nicht ein (Abb. 32). Eine Hemmung des Protonentransportes durch Vanadat trat nur teilweise ein, bei den ATPase-Tests dagegen war sie, wenn auch unter anderen Reaktionsbedingungen, fast vollständig. Zum selben Ergebnis kamen auch BENNETT und SPANSWICK (1984); VARA und SERRANO (1982), die eine Plasmalemma-Protonenpumpe in Phospholipidvesikel einbauen konnten, berichteten zwar über verschiedene Hemmstoffe der Pumpe, nicht aber über Vanadat, welches nur im Hinblick auf die ATPase-Tätigkeit als Inhibitor erwähnt wurde. Offenbar war unter den Versuchsbedingungen, bei denen Protonenfluxe gemessen wurden, die Phosphatbindungsstelle der ATPase für Vanadat nicht zugänglich.

Bei den Messungen, die in Abb. 32 dargestellt sind, wurde ein geringer Unterschied der intravesikulären Ansäuerung in Gegen-

wart verschiedener einwertiger Kationen beobachtet; so differierte die Ansäuerungsgeschwindigkeit in Anwesenheit von K^+ und Li^+ um etwa 10 %. Dies spricht für das Vorkommen eines K^+/H^+-Austauschers auch an der Plasmamembran.

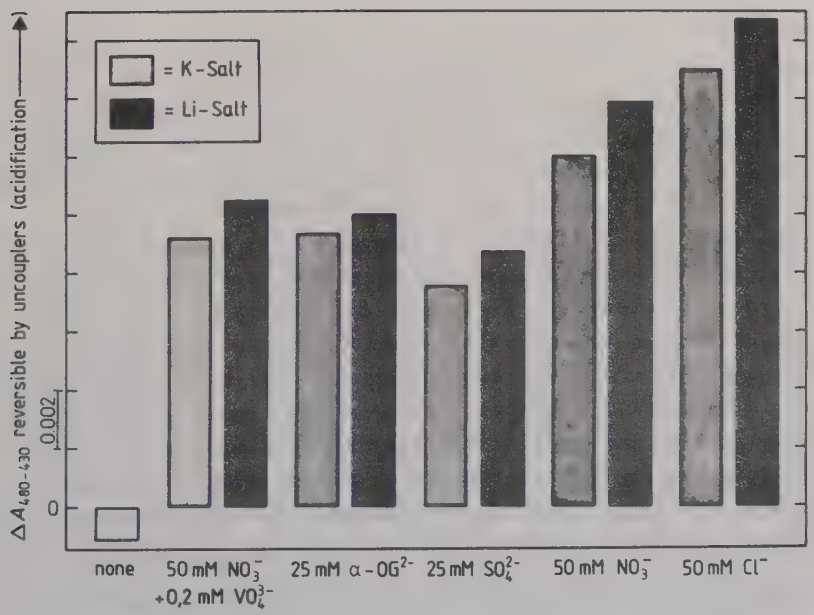

Abb. 32: Anionen- und kationenabhängige Ansäuerungsraten einer 41 %-Fraktion aus einem linearen Saccharosegradienten. Der nitratsensitive Anteil der Protonenpumpe konnte nur teilweise durch Vanadat gehemmt werden.

4. Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß in einem mikrosomalen Pellet (6 000 bis 143 000 x g) von Maiskoleoptilen ATPasen nachweisbar waren, welche, gemäß den Forderungen der MITCHELL-Hypothese, bei der ATP-Hydrolyse Protonen gegen ein Diffusionsgefälle transportieren können. Die Protonenverschiebungen, welche mit Indikatorfarbstoffen photometrisch verfolgt wurden, konnten nach Zugabe entkoppelnder Substanzen, wie Nigericin, Gramicidin oder Trimethylzinnchlorid rückgängig gemacht werden.

Die Unterscheidung dieser ATPasen erfolgte durch isopyknische Dichtegradientenzentrifugation; mit Hilfe der in der Literatur beschriebenen gebräuchlichen Markerenzyme (QUAIL 1979) konnten sie bestimmten Zellorganellen zugeordnet werden. Die Trennschärfe des Dichtegradienten wurde durch verschiedene Maßnahmen erhöht: Einerseits wurde eine Vorzentrifugation nach NAGAHASHI und HIRAIKE (1982) durchgeführt, wodurch bei nur geringen Verlusten an Plasmalemma und ER die Kontamination von mitochondrialen und mikrosomalen Membranen verringert werden konnte, andererseits wurde durch das Auflegen der 6-K-Überstandsfraktion auf den Gradienten ohne eine nochmalige Pelletierung der Membranen, sowie durch Zugabe von EDTA ins Homogenisiermedium ein irreversibles Verkleben unterschiedlicher Membranspezies verhindert. Für eine weitere Optimierung sorgte die lange Zentrifugationsdauer, die eine Trennung der Membranen ausschließlich nach deren Dichte ermöglichte.

Durch die Anwendung des beschriebenen Verfahrens war die Trennschärfe der Dichtegradienten (Abb. 4) gegenüber solchen Trennmethoden erhöht, bei denen entweder ein resuspendiertes Pellet auf einen Gradienten gelegt wurde (DuPONT et al. 1982), oder Mg^{2+} im Gradienten vorhanden war (WAGNER und MULREADY 1983), bei denen die Membranvesikel speziellen Vorbehandlungen unterworfen wurden (SCHERER 1981), oder aber eine isopyknische Äquilibration nicht abgewartet wurde (CHURCHILL

et al. 1983). Durch die hier angewandte Methode konnte z. B., ohne auf das von MANDALA et al. (1982) angewandte Trennverfahren im Dextran-Gradienten zurückgreifen zu müssen, eine Beteiligung des ER am Anteil der protonentranslocierenden Membranen ausgeschlossen werden, obwohl nach HAGER und HELMLE (1981) bzw. DuPONT et al. (1982) ATP-getriebene Protonenpumpen und die NADH-abhängige Cytochrom-C-Reduktase in denselben Fraktionen sedimentierten.

Zunächst war es nur schwer möglich, die ATP-getriebene Protonenpumpaktivität, welche hauptsächlich bei 28 % Saccharose (Dichte 1,12 g/cm^3) bandete, zweifelsfrei bestimmten Organellen zuzuordnen. Die Zugehörigkeit zu Plastidenhüllen wurde ausgeschlossen, weil diese zwar ATPasen besitzen, welche aber im Gegensatz zu den Ergebnissen in Abb. 30 DCCD-insensiviv sind (JOYARD und DOUCE 1975). Die relativ geringe Aktivität der ß-Mannosidase in den fraglichen Fraktionen allein hätte eine Zuordnung der Protonenpumpen zu Tonoplastenmembranen gewagt erscheinen lassen, zumal bei 18 % Saccharose (Dichte 1,08 g/cm^3) schon ein ß-Mannosidase- und ein scharfer, molybdatsensitiver Saurer-Phosphatase-Peak aufgetreten waren. Es lag deshalb nahe, Ergebnisse aus Arbeiten über Membranen, welche ohne größere Reinigung als Tonoplasten identifiziert werden konnten, als Vergleiche heranzuziehen.

Solche Tonoplastenfraktionen sind z. B. aus dem Milchsaft von Hevea brasiliensis (KUNTH) MÜLL.-ARG. isolierbar. Wie MARIN et al. (1981b) zeigten, wurde an diesen Lutoiden durch ATP-Hydrolyse ein pH-Gradient und ein elektrisches Potential (innen sauer bzw. positiv) aufgebaut; letzteres wurde nach Zugabe von permeanten Anionen wieder reduziert (MARIN et al. 1981a). Die ATPasen arbeiten also als elektrogene Pumpen. Der Aufbau des pH-Gradienten wurde ausgenutzt, um Kationen, wie Ca^{2+}, sowie organische Säuren aufzunehmen (MARIN et al. 1982). Die Befunde stimmten nicht nur mit den Ergebnissen von HAGER und HERMSDORF (1981) überein, welche beide einen

von der Protonenpumpe unabhängigen Mechanismus der Ca^{2+}-Aufnahme postulierten, sie belegen auch die Aufnahme des organischen Anions Citrat ins Vesikelinnere. In dieser Arbeit konnten zwar die Anionentransporte nicht unmittelbar gemessen werden, doch ließ sich aus der Anionenabhängigkeit der Ansäuerung in Vesikeln auf eine differentielle Anionenaufnahme schließen. Daß ein solcher Schluß erlaubt ist, belegen die Ergebnisse von METTLER et al. (1982), welche an mikrosomalen Membranen von Maiskoleoptilen eine von einem pH-Gradienten abhängige Aufnahme von $^{36}Cl^-$ fanden. Auch von HAGER und BERTHOLD (unveröffentlicht) wurden solche Versuche durchgeführt, und es zeigte sich dabei, daß außer $^{36}Cl^-$ auch ^{14}C-Succinat aktiv in die beschriebenen Vesikel aufgenommen wird, daß dagegen ^{14}C-Oxalat, welches keine Steigerung der ATP-getriebenen Protonenpumpaktivität bewirkte (Abb. 18), nur bis zu einem Diffusionsgleichgewicht ins Vesikelinnere aufgenommen wurde.

Die Aufnahme der organischen Dicarboxylatanionen Oxalacetat, Malat, Tartrat, Fumarat, α-Ketoglutarat, Aspartat und Glutamat wurde in diesem Zusammenhang noch nirgends bschrieben, es lagen lediglich Hinweise einer ATP-abhängigen Malataufnahme in Vakuolen von Kalanchoe-Mesophyll-Protoplasten (GANSER et al. 1982), sowie in Hevea-Lutoide (MONTARDY und LAMBERT 1977) vor; dagegen führten BUSER-SUTER et al. (1982) die Malat-Aufnahme in Vakuolen von CAM-Pflanzen nicht auf die Anwesenheit von ATP zurück. - Nach den Ergebnissen dieser Arbeit muß allerdings davon ausgegangen werden, daß die erwähnten Dicarboxylate im Cotransport mit Protonen ins Vakuoleninnere aufgenommen werden. Sie passieren die Tonoplastenmembran über einen Dicarboxylatkanal, der sich aufgrund seiner Arbeitsweise, wie auch in seinen Eigenschaften gegenüber seinen Substraten grundlegend von denen der Mitochondrien (SLUSE-GOFFART et al. 1983) und der Chloriplasten (LEHNER und HELDT 1978) unterscheidet. Ob er, wie dies vom Chloridkanal mikrosomaler Maiswurzelvesikel (BENNETT und SPANSWICK 1983) gefordert wird, eng mit der ATPase verknüpft ist,

kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht beurteilt werden. Das Fehlen einer Citrataufnahme, welche von MARIN et al. (1982) beschrieben wurde, mag objektsspezifisch sein: Es liegen Ergebnisse vor (HAGER und MACK, unveröffentlicht), daß bei Characeen unter denselben Versuchsbedingungen wie bei Maisvakuolen eine Citratstimulation der mikrosomalen Protonenpumpe vorliegt.

Ein weiterer Vergleich mit Hevea-Lutoiden bezog sich auf spezifische SH-Hemmstoffe: MARIN (1983) zeigte, daß ATPasen, welche aufgrund ihrer Funktionsweise den Protonenpumpen gleichgesetzt werden können (CHRESTIN et al. 1984), sensitiv gegenüber mikromolaren Mengen von NEM und pHMB reagierten, die Hemmung der Plasmalemma-ATPase von Neurospora erforderte demgegenüber ungleich höhere Konzentrationen von SH-Gruppen-Giften (BROOKER und SLAYMAN 1982); dieselben Befunde ergaben sich an den in dieser Arbeit isolierten Vesikeln (Abb. 12 und 15).

Das Auftreten von zwei verschieden schweren Banden im Saccharosegradienten wurde kürzlich auch von POOLE et al. (1984) beobachtet. Die Autoren ordneten beide aufgrund von Inhibitorexperimenten den Vakuolen zu. Als wichtigstes Charakterisierungsmerkmal erwies sich dabei die Nitratsensitivität (O'NEILL et al. 1983). Nitrat erwies sich als einer der Inhibitoren an Vakuolenvesikeln, sei es, daß die ATPase untersucht wurde (Abb. 10) oder aber die ATP-getriebene Protonenpumpaktivität (HAGER und HELMLE 1981). Nitrat muß, um inhibitorisch zu wirken, in hohen Konzentrationen zugeführt werden. De MICHELIS et al. (1983) fanden bei Rettichvakuolen einen I_{50}-Wert von 1,3 mM KNO_3; bei AOKI und NISHIDA (1984), welche die Inhibitorkonzentrationen bei Kalanchoe-Vakuolen nur bis maximal 1 mM einsetzten, wurde Nitrat folgerichtig nicht als Hemmstoff erkannt.

Ungelöst bleibt die mangelhafte Zuordnungsmöglichkeit der nitratsensitiven Protonenpumpe mit der nitratsensitiven ATPase. Eine direkte Korrelation beider Komponenten gelang bisher nur bei Vesikeln von Haferkoleoptilen (Abb. 5) bzw. Haferwurzeln

(O'NEILL et al. 1983). Bei Maisvesikeln war demgegenüber der Hauptanteil der nitratsensitiven ATPase bei 29 - 30 % Saccharose (Dichte 1,13 g/cm^3) anzutreffen, die H^+-Pumpe aber bei 27 bis 28 %. Diese Diskrepanz kann nur damit erklärt werden, daß sich unter den Tonoplastenvesikeln verschiedene Populationen befinden (inside-out- bzw. right side-out-Vesikel), welche sich infolge der EDTA-Behandlung in ihren Dichten geringfügig unterscheiden, so wie es RANDALL und RUESINK (1983) an Plasmamembranen von Karottenprotoplasten beschrieben haben. Eine intravesikuläre Protonenakkumulation zeigen nur die right side-out-Vesikel, während inside-out-Vesikel nach einem osmotischen Schock zur ATP-Hydrolyse fähig sind.

Der Versuch einer Kategorisierung von ATPasen oder Protonenpumpen über die ermittelten K_m-Werte zu versuchen und damit auch eine Zuordnung zu bestimmten Membranen zu erreichen, stieß auf große Schwierigkeiten, denn die in der Literatur beschriebenen K_m-Werte streuen über einen breiten Bereich: MARIN et al. (1982) ermittelten, um halbmaximale Aktivitäten zu erhalten, Werte von 0,4 bis 0,8 mM, CHURCHILL und SZE (1983) 0,11 mM, O'NEILL et al. (1983) 0,10 mM und AOKI und NISHIDA 0,55 mM ATP. Weil dabei nicht nur das Pflanzenmaterial, sondern auch die Versuchsbedingungen wechselten, war es unmöglich, die verschiedenen Werte miteinander in Korrelation zu bringen.

Demgegenüber erscheint die Zuordnung einer ATPase wegen deren Sensitivität gegenüber Orthovanadat eindeutig zu sein, denn Vanadat wurde schon vor Jahren bei in vivo- und in vitro-Versuchen als Hemmstoff für Plasmalemma-ATPasen beschrieben (JACOBS und TAIZ 1980; PERLIN und SPANSWICK 1981). Selbst bei niederen Pflanzen, z. B. Hefen, kann durch Zusatz von Vanadat die Herkunft der Vesikelpopulation ermittelt werden (MALPARTIDA und SERRANO 1981; OKOROKOV und LICHKO 1983).

Daß die Plasmalemma-ATPase ebenfalls als elektrogene, protonentranslocierende Pumpe wirkt, konnte bisher erst vereinzelt gezeigt werden (KEIFER et al. 1982; De MICHELIS et al. 1983; BENNETT et al. 1984). Die Diskrepanz zwischen ATPase- und Protonenpump-Versuchen lag offenbar am überwiegenden Vorliegen von right side-out-Vesikeln der Plasmamembran. Weil ATPase-Tests in der Regel mit einem osmotischen Schock verbunden sind (Abb. 14), konnte eine ATP-Hydrolyse im Gegensatz zur intravesikulären Ansäuerung immer nachgewiesen werden. Ähnliche Überlegungen wurden auch von MØLLER et al. (1984) geäußert; diese Autoren hatten festgestellt, daß bei Weizen- und Hafervesikeln die ATPase-Tätigkeit sich nach der Behandlung mit Ultraschall wesentlich erhöhte. Die Protonenpump-Aktivität der wenigen inside-out-Vesikel konnte von den meisten Autoren nicht erkannt werden, weil die Experimente oft bei pH 7,5 durchgeführt wurden; bei diesem pH ist, zumindest bei Vesikeln aus Maiskoleoptilen, die ATPase-Tätigkeit sehr gering (siehe Abb. 11).

Aufgrund der Unterschiede zwischen den Protonenpumpen am Plasmalemma und am Tonoplasten, welche in Abb. 33 schematisch abgebildet sind, wurde eine Identifizierung der betreffenden ATPase, sowie eine Zuordnung zu bestimmten Organellen ermöglicht.

Diese unterschiedlichen Eigenschaften der H^+-Pumpen an Plasmalemma und Tonoplast scheinen auch für ihre Regulation in vivo eine Rolle zu spielen. Die Plasmalemma-ATPase kann durch geringe Änderungen des cytoplasmatischen pH-Wertes drastisch ihre Aktivität variieren. Diese Tatsache könnte zur Erklärung einiger Wachstumsphänomene herangezogen werden: So könnte die beim ANA-Effekt verursachte Wachstumssteigerung durch Akkumulation von Milchsäure im Zellsaft (HAGER 1980; ABELE 1983) über eine pH-Aktivierung der Plasmalemma-ATPase erklärt werden. Dasselbe trifft für die Induktion des Streckungswachstums durch bestimmte Wuchsstoffe zu. So können Carboxyester,

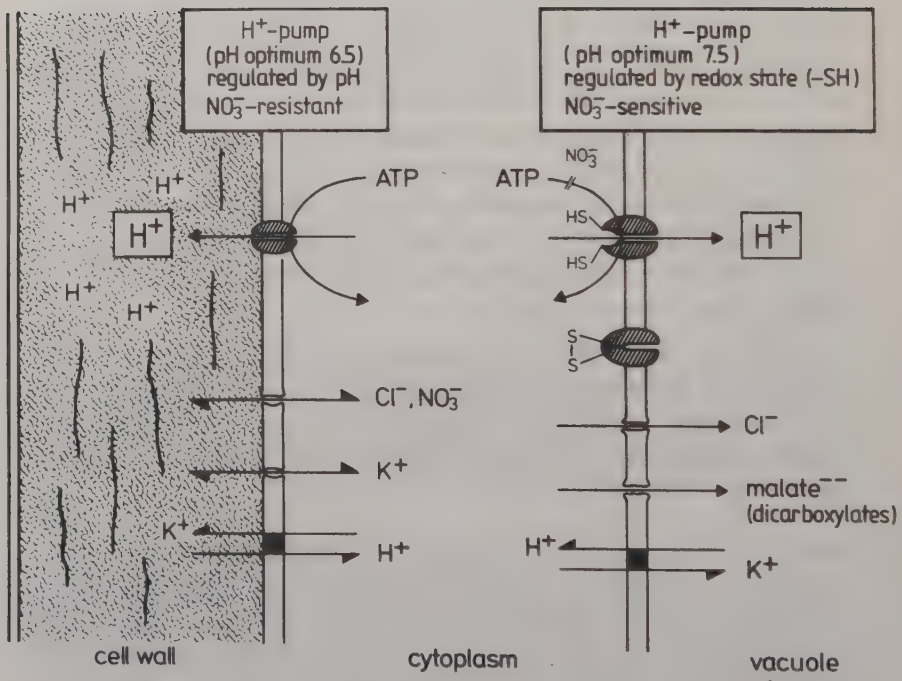

Abb. 33: Zusammenfassende Darstellung der unterschiedlichen Eigenschaften für die Protonenpumpen an Tonoplast und Plasmalemma.

wie Naphthylacetat und Fusicoccin eine Absenkung des cytoplasmatischen pH-Wertes dadurch bewirken, daß sie durch Esterasen im Cytoplasma gespalten werden, wobei Essigsäure freigesetzt wird (HAGER und MOSER 1984). Es ließe sich dadurch auch erklären, warum Versuche mit Fusicoccin, von welchem die Aktivierung einer Plasmalemma-ATPase gefordert wird (MARRÈ 1979), niemals eine direkte Steigerung der Protonenpump-Aktivität unter in vitro-Bedingungen (welche ausschließlich in stark gepufferten Medien durchgeführt werden) erbrachten (PERLIN und SPANSWICK 1981; SZE 1983). Hypothetische Überlegungen, daß auch IES über eine Absenkung des cytoplasmatischen pH-Wertes wirkt, wurden kürzlich von BRUMMER und PARISH (1983) angestellt.

Im Unterschied zu der eben besprochenen Plasmalemma-ATPase besitzt die Protonenpumpe des Tonoplasten ein sehr breites pH-Optimum, welches für eine Regulation wenig geeignet erscheint. Auch die Nitratempfindlichkeit könnte nur bei sehr hohen NO_3^--Konzentrationen im Cytoplasma von Wichtigkeit sein. Eine andere Möglichkeit der Regulation ergibt sich aber aus dessen SH-Empfindlichkeit. Deshalb muß dem Redox-Zustand des Cytoplasmas große Bedeutung beigemessen werden. Wie von KRAUSS et al. (1983; 1984) gezeigt wurde, durch Photooxidationen, SH-Gruppen, welche im Hinblich auf die Protonentranslocation entscheidende Funktionen haben, inaktiviert werden; umgekehrt verhindert das Vorhandensein von reduzierenden Substanzen, wie Glutathion, diese photodynamischen Prozesse, es kommt sogar zur Reaktivierung eines bereits inaktiven Enzyms. Auf das Regulativ des SH/SS-Verhältnisses sollten deshalb die reversible Malatspeicherung in Vakuolen von CAM-Pflanzen, sowie die Turgorregulation, z. B. in den Schließzellen von Spaltöffnungen, beruhen. - Es wird sich in Zukunft erweisen, ob den hier gefundenen und beschriebenen Steuerungsmechanismen eine Bedeutung zugemessen werden kann.

5. Zusammenfassung

- An mikrosomalen Vesikeln von Maiskoleoptilen wurden Untersuchungen über das Vorhandensein und die Arbeitsweise von ATP-getriebenen Protonenpumpen untersucht, indem die Aufnahme der Indikatorfarbstoffe Neutralrot, 9-Aminoacridin und Quinacrin, welche jeweils meßspezifische Vor- und Nachteile aufwiesen, kontinuierlich verfolgt wurde.

- Die untersuchten Membranen wurden mit Hilfe von linearen, isopyknischen Saccharosegradienten aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte aufgetrennt, anhand von Markerenzymen identifiziert und bestimmten Organellen zugeordnet.

- Es zeigte sich, daß ein Teil der Protonenpumpen den Vesikeln des Plasmalemmas und ein anderer Teil denen von intakten Vakuolen bzw. Tonoplastenvesikeln zuzuordnen waren. Die Protonenpumpen dieser Vesikel konnten aufgrund ihrer ATPase-Aktivitäten, welche durch Protonophoren stimulierbar waren, als solche erkannt werden. Phosphatasen des Golgi-Apparates besaßen keine protonentranslocierenden Eigenschaften.

- Protonenpumpen, welche Plasmalemma-Vesikeln angehörten, wiesen geringe Pumpaktivitäten auf; auch waren Plasmalemma-ATPasen nur dann aktiv, wenn die Membranen vor dem ATPase-Test osmotisch geschockt wurden. Dies war ein Indiz für das überwiegende Vorliegen von right side-out-Vesikeln der Plasmamembran.

- ATPasen, wie auch Protonenpumpen von Tonoplast und Plasmalemma unterschieden sich in ihren Aktivitäten (Plasmalemma: schmales Optimum bei pH 6,5, K_m-Wert 0,39 mM ATP; Tonoplast: breites Optimum bei pH 7,5, K_m-Wert 0,29 bzw. 0,24 mM ATP), sowie in ihrer Empfindlichkeit gegenüber SH-Gruppengiften (Tonoplast empfindlicher) und anderen Hemmstoffen (Plasmalemma: vanadatsensitiv, Tonoplast: nitratsensitiv).

- Speziell die ATPase am Tonoplast konnte als elektrogene Pumpe identifiziert werden: Unter ATP-Verbrauch bildete sich ein elektrisches Potential aus (innen positiver), welches nach Zugabe von Chlorid schnell, von Dicarboxylat (z. B. α-Ketoglutarat) langsam reduziert wurde. Gleichzeitig konnte eine H^+-Translocation (innen sauer) nachgewiesen werden, welche abhängig war vom anwesenden Anion. Außer einer schnellen, chloridabhängigen Ansäuerung wurde auch ein langsamer H^+-Transport in die Vesikel bei Anwesenheit von C_4- und C_5-Dicarboxylaten gemessen werden. Dieser stand in Korrelation mit der ATPase-Aktivität.

- Als ein Sekundärprozess wurde die in alkalischem Milieu auftretende Kationenabhängigkeit der H^+-Nettotransportrate gedeutet: Diese wurde stimuliert in der Reihenfolge $K^+ < Na^+ < Rb^+ < Tris^+ < Cs^+ < Li^+ < Cholin^+$. Weil die Kationen keinen Einfluß auf den K_m-Wert der Protonenpumpe hatten, und weil die H^+-Effluxrate nach Hemmung der Protonenpumpe mit DCCD dieselbe Kationenabhängigkeit aufwies, wurde für die Membranen ein pH-abhängiger K^+/H^+-Austauscher postuliert.

6. Literaturverzeichnis

Abele, B. (1983) Untersuchungen zum molekularen Mechanismus des zeitlich begrenzten Säurewachstums bei Avenakoleoptilen nach Anaerobiose. Dissertation, Universität Tübingen

Aoki, K., Nishida, K. (1984) ATPase activity associated with vacuoles and tonoplast vesicles isolated from the CAM plant, Kalanchoe daigremontiana. Physiol. Plant. 60, 21-25

Bennett, A.B., Spanswick, R.M. (1983) Optical measurements of ΔpH and $\Delta\Psi$ in corn root membrane vesicles: kinetic analysis of Cl^- effects on a proton-translocating ATPase. J. Membrane Biol. 71, 95-107

Bennett, A.B., O'Neill, S.D., Spanswick,R.M. (1984) H^+-ATPase activity from storage tissue of Beta vulgaris. Identification and characterization of an anion-sensitive H^+-ATPase. Plant Physiol. 74, 538-544

Bigdon, M., Böttger, M. (1982) Regulation des externen pH-Wertes bei Maiskoleoptilen. Botanikertagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Poster 383

Brey, R.N., Rosen, B.P. (1979) Cation/proton antiport systems in Escherichia coli. Properties of the calcium/proton antiporter. J. Biol. Chem. 254, 1957-1963

Briskin, D.P., Poole, R.J. (1983) Characterization of a K^+-stimulated adenosine triphosphatase associated with the plasma membrane of red beet. Plant Physiol. 71, 350-355

Brooker, R.J., Slayman C.W. (1982) Inhibition of the plasma membrane $[H^+]$-ATPase of Neurospora crassa by N-Ethylmaleimide. Protection by nucleotides. J. Biol. Chem. 257, 12051-12055

Brummer, B., Parish, R.W. (1983) Mechanism of auxin-induced plant cell elongation. FEBS Lett. 161, 8-12

Buser-Suter, C., Wiemken, A., Matile, P. (1982) A malic acid permease in isolated vacuoles of a crassulacean acid metabolism plant. Plant Physiol. 69, 456-459

Chen, P.S., Toribara, T.Y., Warner, H. (1956) Microdetermination of phosphorus. Anal. Chem. 28, 1756-1758

Chrestin, H., Gidrol, X., Marin, B., Jacob, J.L., D'Auzac, J. (1984) Role of the lutoidic tonoplast in the control of the cytosolic homeostasis within the laticiferous cells of Hevea. Z. Pflanzenphysiol. 114, 269-277

Churchill, K.A., Sze, H. (1983) Anion-sensitive, H^+-pumping ATPase in membrane vesicles from oat roots. Plant Physiol. 71, 610-617

Churchill, K.A., Holaway, B., Sze, H. (1983) Separation of two types of electrogenic H^+-pumping ATPases from oat roots. Plant Physiol. 73, 921-928

Cocucci, M., Ballarin-Denti, A., Marrè, M.T. (1980) Effects of orthovanadate on H^+-secretion, K^+-uptake, electric potential difference and membrane ATPase activities of higher plant tissues. Plant Sci. Lett. 17, 391-400

Cooper, T.G., Beevers, H. (1969) Mitochondria and glyoxysomes from castor bean endosperm. Enzyme constituents and catalytiv capacity. J. Biol. Chem. 244, 3507-3513

Dauwalder, M., Whaley, W.G., Kephart, J.E. (1969) Phosphatases and differentiation of the golgi apparatus. J. Cell Sci. 4, 455-497

Day, D.A., Hanson, J.B. (1978) On methods for the isolation of mitochondria from etoilated corn shoots. Plant Sci. Lett. 11, 99-104

De Klerk-Kiebert, Y.M., Kneppers, T.J.A., Matthijs, H.C.P., Verleur, J.D. (1983) Sugar uptake in soybean (Glycine max.) cells in suspension culture. Physiol. Plant. 57, 217-221

Dell'Antone, P., Cusinato, O., Volpato, O. (1978) Mechanism of acridine uptake by submitochondrial particles. Arch. Biochem. Biophys. 191, 413-425

De Michelis, M.I., Pugliarello, M.C., Rasi-Caldogno, F. (1983) Two distinct proton translocating ATPases are present in membrane vesicles from radish seedlings. FEBS Lett. 162, 85-90

De Pierre, J.W., Ernster, L. (1977) Enzyme topology of intracellular membranes. Ann. Rev. Biochem. 46, 201-262

Douce, R., Holtz, B., Benson, A.A. (1973) Isolation and properties of the envelope of spinach chloroplasts. J. Biol. Chem. 248, 7215-7222

Douce, R. (1974) Site of biosynthesis of galactolipids in spinach chloroplasts. Science 183, 852-853

Du Pont, F.M., Bennett, A.B., Spanswick, R.M. (1982) Localization of a proton-translocating ATPase on sucrose gradients. Plant Physiol. 70, 1115-1119

Gallagher, S.R., Leonard, R.T. (1982) Effect of vanadate, molybdate and azide on the membrane-associated ATPase and soluble phosphatase activities of corn roots. Plant Physiol. 70, 1335-1340

Ganser, R., Hampp, R., Ziegler, H. (1982) Der Transport von Äpfelsäure in die Vakuole von Kalanchoe-Mesophyll-Protoplasten ist ATP-abhängig. Botanikertagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft in Freiburg (Br.), Poster 448

Gillies, R.J., Deamer, D.W. (1979) Intracellular pH: Methods and applications. In: Current topics in bioenergetics, vol. 9, pp. 63-87, Sanadi, D.R., ed. Academic Press, San Francisco New York London

Grob, K., Matile, P. (1979) Vacuolar location fo glucosinolates in horseradish root cells. Plant Sci. Lett. 14, 327-335

Guy, M., Reinhold, L., Michaeli, D. (1979) Direct evidence for a sugar transport mechanism in isolated vacuoles. Plant Physiol. 64, 61-64

Hager, A. (1971) Das differenzielle Wachstum bei photo- und geotropischen Krümmungen. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 84, 331-350

Hager, A., Menzel, H., Krauss, A. (1971) Versuche und Hypothese zur Primärwirkung des Auxins beim Streckungswachstum. Planta 100, 47-75

Hager, A., Frenzel, R., Laible, D. (1980) ATP-dependent proton transport into vesicles of microsomal membranes of Zea mays coleoptiles. Z. Naturforsch. 35c, 783-793

Hager, A. (1980) Avena coleoptile segments: Hyperelongation growth after anaerobic treatment. Z. Naturforsch. 35c, 794-804

Hager, A., Helmle, M. (1981) Properties of an ATP-fueled, Cl^--dependent proton pump localized in membranes of microsomal vesicles from maize coleoptiles. Z. Naturforsch. 36c, 997-1008

Hager, A., Hermsdorf, P. (1981) A H^+/Ca^{2+} antiporter in membranes of microsomal vesicles from maize coleoptiles, a secondary energized Ca^{2+} pump. Z. Naturforsch. 36c, 1009-1012

Hager, A., Moser, I. (1984) Acetic acid esters (naphthylacetate, fusicoccin etc.) and permeable weak acids induce active H^+ extrusion ans extension growth of coleoptile segments by lowering the cytoplasmatic pH. Planta, in press

Hall, J.L. (1983) Plasma membranes. In: Isolation of membranes and organelles from plant cells, pp. 55-81, Hall, J.L., Moore, A.L., eds. Academic Press, London New York

Haraux, F., De Kouchkovsky, Y. (1980) Measurement of chloroplast internal protons with 9-aminoacridine. Probe binding, dark proton gradient, and salt effects. Biochim, Biophys. Acta 592, 153-168

Hendrix, D.L., Pierce, W.S. (1980) Preliminary characterization of an anion-stimulated ATPase from Pisum plasma membrane. Plant Sci. Lett. 18, 365-373

Haschke, H.-P., Lüttge, U. (1977) Auxin action on K^+-H^+-exchange and growth, $^{14}CO_2$-fixation and malate accumulation in Avena coleoptile segments. In: Regulation of cell membrane activities in plants, pp.243-249, Marrè, E., Ciferri, O., eds. North-Holland, Amsterdam Oxford New York

Henry, R.J., Stone, B.A. (1982) Factors influencing ß-glucan-synthesis by particulate enzymes from suspension-cultured Lolium multiflorum endosperm cells. Plant Physiol. 69, 632-636

Hodges, T.K. (1976) ATPases associated with membranes in plant cells. In: Encyclopedia of plant physiology, N.S., vol. 2: Transport in plants II, pp. 260-283, Lüttge, U., Pitman, M.G., eds. Springer, Berlin Heidelberg New York

Hodges, T.K., Leonard, R.T., Bracker, C.E., Keeman, C.E. (1972) Purification of an ion-stimulated adenosine triphosphatase from plant roots associated with plasma membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 3307-3311

Hodges, T.K., Leonard, R.T. (1974) Purification of a plasma-membrane-bound adenosine triphosphatase from plant roots. Methods Enzymol. 32, 392-406

Hong, Y.Q., Junge, W. (1983) Localized or delocalized protons in photophosphorylation? On the accessibility of the thylacoid lumen for ions and buffers. Biochim. Biophys. Acta 722, 197-208

Huang, C.-S., Kopacz, S.J., Lee, C.P. (1983) Mechanistic differences in energy-linked fluorescence of 9-Aninoacridine dyes associated with bovine heart submitochondrial membranes. Biochim. Biophys. Acta 722, 107-115

Jacobs, M., Taiz, L. (1980) Vanadate inhibition of auxin-enhanced H^+-secretion and elongation in pea epicotyls and oat coleoptiles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7242-7246

Joyard, J., Douce, R. (1975) Mn-dependent ATPase of the envelope of spinach chloroplasts. FEBS Lett. 57, 335-340

Kagawa, Y. (1982) Net ATP synthesis by H^+-ATPase reconstituted into liposomes. In: Current Topics in Membranes and Transport, vol. 16: Electronic Pumps, pp. 195-213, Slayman, C.L., ed. Academic Press, New York London

Kawamura, G., Tazawa, M. (1981) Rapid light-induced potential change in Chara cells stained with neutral red in the absence of internal Magnesium-ATP. Plant Cell Physiol. 21, 547-560

Keifer, D.W., Franceschi, V.R., Lucas, W.J. (1982) Plasmalemma chloride transport in Chara corallina. Inhibition by 4,4'-diisothiocyano-2,2'-disulfonic acid stilbene. Plant Physiol. 70, 1327-1334

Krauss, W., Biber, W., Stransky, H., Hager, A. (1983) Blue light mediated inhibition of ATP-dependent proton accumulation in microsomal vesicles from Zea mays. 2nd international Conference on the effect of Blue Light in Plants and Microorganisms in Marburg, Poster 20

Krauss, W., Eberl, D., Stransky, H., Hager, A. (1984) Hemmung des ATP-getriebenen Protonentransports an Tonoplasten der Maiskoleoptile durch Licht (bei Anwesenheit von Flavinen) und durch Photooxidationsprodukte der IES. Botanikertagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft in Wien

Lee, C. (1971) A fluorescent probe of the hydrogen ion concentration in ethylenediaminetetraacetic acid particles of beef heart mitochondria. Biochemistry 10, 4375-4381

Lee, H.C., Forte, J.G. (1978) A study of H^+ transport in gastric microsomal vesicles using fluorescent probes. Biochim. Biophys. Acta 508, 339-356

Lehner, K., Heldt, H.W. (1978) Dicarboxylate transport across the inner membrane of the chloroplast envelope. Biochim. Biophys. Acta 501, 531-544

Leigh, R.A., ap Rees, T., Fuller, W.A., Banfield, J. (1979) Location of acid invertase activity and sucrose in the vacuoles of storage roots of red beet (Beta vulgaris L.). Biochem. J. 178, 539-547

Leigh, R.A., Walker, R.R. (1980) ATPase and acid phosphatase activities associated with vacuoles isolated from storage roots of red beet (Beta vulgaris L.). Planta 150, 222-229

Leigh, R.A. (1983) Methods, progress and potential for the use of isolated vacuoles in studies of solute transport in higher plant cells. Physiol. Plant. 57, 390-396

Leong, T.-Y., Vierstra, R.D., Briggs, W.R. (1981) A blue light-sensitive cytochrome-flavin complex from corn coleoptiles. Further characterization. Photochem. Photobiol. 34, 697-703

Lichtenthaler, H.K., Prenzel, U., Douce, R., Joyard, J. (1981) Localization of Prenylquinones of the envelope of spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 641, 99-105

Lin, W. (1984) Further characterization of the transport property of plasmalemma NADH oxidation system in isolated corn root protoplasts. Plant Physiol. 74, 219-222

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275

Lundborg, T., Jensén, P., Kylin, A. (1983) The relationship between Rb^+ influx and K^+-stimulated Mg^{2+}-ATPase activity in oat roots of different K^+ status - flexible coupling? Physiol. Plant. 59, 277-284

Malpartida, F., Serrano, R. (1981) Proton translocation catalysed by the purified yeast plasma membrane ATPase reconstituted in liposomes. FEBS Lett. 131, 351-354

Mandala, S., Mettler, I.J., Taiz, L. (1982) Localization of the proton pump of corn coleoptile microsomal membranes by density gradient centrifugation. Plant Physiol. 70, 1743-1747

Marin, B., Smith, A.C., Lüttge, U. (1981a) The electrochemical proton gradient and its influence on citrate uptake in tonoplast vesicles of Hevea brasiliensis. Planta 153, 486-493

Marin, B., Marin-Lanza, M., Komor, E. (1981b) The protonmotive potential difference across the vacuo-lysosomal membrane of Hevea brasiliensis (rubber tree) and its modification by a membrane-bound adenosine triphosphatase. Biochem. J. 198, 365-372

Marin, B., Crétin, H., D'Auzac, J. (1982) Energization of solute transport and accumulation at the tonoplast in Hevea latex. Physiol. Vég. 20, 333-346

Marin, B. (1983) Sensitivity of tonoplast-bound adenosine-triphosphatase from Hevea to inhibitors. Plant Physiol. 73, 973-977

Marmé, D., Marrè, E., Hertel, R., eds. (1982) Plasmalemma and tonoplast: their functions in the plant cell. Elsevier, Amsterdam New York Oxford

Marrè, E. (1979) Fusicoccin, a tool in plant physiology. Ann. Rev. Plant Physiol. 30, 273-288

Mettler, I.J., Mandala, S., Taiz, L. (1982) Characterization of in vitro proton pumping by microsomal vesicles isolated from corn coleoptiles. Plant Physiol. 70, 1738-1742

Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. Nature 191, 144-148

Møller, I.M., Lundborg, T., Bérczi, A. (1984) The negative surface density of plasmalemma vesicles from wheat and oat roots. FEBS Lett. 167, 181-185

Montardy, M.C., Lambert, C. (1977) Diverses propriétés de l'absorption du citrate du malate et du succinate par les lutoides du latex d'Hevea brasiliensis. Photochemistry 16, 677-680

Morré, D.J., Lembi, C.A., Van der Woude, W.J. (1977) A latent Inosine-5'-diphosphatase associated with golgi apparatus-rich fractions from onion stem. Cytobiologie 16, 72-81

Nagahashi, J., Hiraike, K. (1982) Effects of centrifugal force and centrifugal time on the sedimentation of plant organelles. Plant Physiol. 69, 546-548

Okorokov, L.A., Lichko, L.P. (1983) The identification of a proton pump on vacuoles of the yeast Saccaromyces carlsbergiensis. ATPase is electrogenic H^+-translocase. FEBS Lett. 155, 102-106

O'Neill, S.D., Bennett, A.B., Spanswick, R.M. (1983) Characterization of a NO_3^--sensitive H^+-ATPase from corn roots. Plant Physiol. 72, 837-846

Palmieri, F., Stipani, I. (1981) Electroneutral and electrogenic transport of anions across the mitochondrial inner membrane. Biol. ZBlatt 100, 515-526

Perlin, D.S., Spanswick, R.M. (1981) Characterization of ATPase activity associated with corn leaf plasma membranes. Plant Physiol. 68, 521-526

Pick, U., Avron, M. (1976) Neutral red response as a measure of the pH-Gradient across chloroplast membranes in the light. FEBS Lett. 65, 348-353

Poole, R.J. (1978) Energy coupling for membrane transport. Ann. Rev. Plant Physiol. 29, 437-460

Poole, R.J., Briskin, D.P., Krátký , Z., Johnstone, R.M. (1984) Density gradient localization of plasma membrane and tonoplast from storage tissue of growing and dormant red beet. Characterization of proton-transport and ATPase in tonoplast vesicles. Plant Physiol. 74, 549-556

Quail, P.H. (1979) Plant cell fractionation. Ann. Rev. Plant Physiol. 30, 425-484

Randall, S.K., Ruesink, A.W. (1983) Orientation and integrity of plasma membrane vesicles obtained from carrot protoplasts. Plant Physiol. 73, 385-391

Raven, J.A., Smith, F.A. (1977) Characteristics, functions and regulation of active proton extrusion. In: Regulation of Cell membrane activities in plants, pp. 25-40, Marrè, E., Ciferri, O., eds. North-Holland, Amsterdam Oxford New York

Ray, P.M., Shininger, T.L., Ray, M.M. (1969) Isolation of ß-Glucan synthetase particles from plant cells and identification with golgi membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 64, 605-612

Rayle, D.L., Cleland, R. (1970) Enhancement of wall-loosening and elongation by acid solutions. Plant Physiol. 46, 250-253

Robinson, D.G., Eberle, M., Hafemann, C., Wienecke, K., Graebe, J.E. (1982) Mg^{2+}-shifting of plasma membrane associated glucan synthetase activity. Z. Pflanzenphysiol. 105, 323-330

Robinson, D.G., Glas, R. (1983) The glucan synthases from suspension-cultured sugar cane cells. J. Exp. Botany 34, 668-675

Scherer, G.F.E. (1981) Auxin-stimulated ATPase in membrane fractions from pumpkin hypocotyls (Cucurbita maxima L.). Planta 151, 434-438

Scherer, G.F.E. (1984) H^+-ATPase and auxin-stimulated ATPase in membrane fractions from zucchini (Cucurbita pepo L.) and pumpkin (Cucurbita maxima L.) hypocotyls. Z. Pflanzenphysiol. 114, 233-237

Selwyn, M.A., Dawson, A.P., Stockalde, M., Gains, N. (1970) Chloride-hydroxide exchange across mitochondrial, erythrocyte and artificial lipid membranes mediated by trialkyl-and triphenyltin compounds. Eur. J. Biochem. 14, 120-126

Siefermann-Harms, D. (1978) The accumulation of neutral red in illuminated thylacoids. Biochim. Biophys. Acta 504, 265-277

Simon, R., Bonzon, M., Greppin, H., Marmé, D. (1984) subchloroplastic localization of NAD kinase activity: Evidence for a Ca^{2+}, calmodulin-dependent activity at the envelope and for a Ca^{2+}, calmodulin-independent activity in the stroma of pea chloroplasts. FEBS Lett. 167, 332-338

Sluse-Goffart, M., Duyckaerts, C., Richard, M., Hengesch, P., Liébecq, C. (1983) Conformational changes and possible structure of the oxoglutarate translocator of rat-heart mitochondria revealed by the genetic study of malate and oxoglutarate uptake. Eur. J. Biochem. 134, 397-406

Sone, N., Yoshida, M., Hirata, H., Harumasa, O., Kagawa, Y. (1976) Electrochemical potential of protons in vesicles reconstituted from purified, proton-translocating adenosine triphosphatase. J. Membrane Biol. 30, 121-134

Spanswick, R.M. (1981) Electrogenic ion pumps. Ann. Rev. Plant Physiol. 32, 267-289

Sze, H., Hodges, T.K. (1977) Selectivity of alkali kation influx across the plasma membrane of oat roots. Kation specifity of the plasma membrane ATPase. Plant Physiol. 59, 641-646

Sze, H. (1980) Nigericin-stimulated ATPase activity in microsomal vesicles of tobacco callus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5904-5908

Sze, H. (1983) Proton-pumping adenosine triphosphatase in membrane vesicles of tobacco callus. Sensitivity to vanadate and K^+. Biochim. Biophys. Acta 732, 586-594

Thom, M., Komor, E., Maretzki, A. (1982) Vacuoles from sugarcane suspension cultures: II. Characterization of sugar uptake. Plant Physiol. 69, 1320-1324

Van der Woude, W.J., Lembi, C.A., Morré, D.J., Kindinger, J.I., Ordin, L. (1974) ß-glucan synthetases of plasma membrane and golgi apparatus from onion stem. Plant Physiol. 54, 333-340

Vara, F., Serrano, R. (1982) Partial purification and properties of the proton-translocating ATPase of plant plasma membranes. J. Biol. Chem. 257, 12826-12830

Wagner, G.J., Mulready, P. (1983) Characterization and solubilization of nucleoside-specific, Mg^{2+}-ATPase and Mg^{2+}pyrophosphatase of tonoplast. Biochim. Biophys. Acta 728, 267-280

Widell, S., Lundborg, T., Larsson, C. (1982) Purification of plasma membrane by phase partition. In: Developments in Plant biology, vol. 7: Plasmalemma and tonoplast: Their functions in the plant cell, pp. 121-128, Marmé, D., Marrè, E., Hertel, R., eds. Elsevier, Amsterdam New York Oxford

Beim Abschluß dieser Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. A. Hager für die Bereitstellung des Themas und sein immerwährendes Interesse am Fortgang der Arbeit meinen herzlichsten Dank aussprechen.

Mein Dank gilt außerdem allen Mitarbeitern des Lehrbereichs Allgemeine Botanik, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen, insbesondere Frau K. Lühring für ihre Hilfe bei der Durchführung meiner Versuche.

Lebenslauf

30. 3. 1957	Geboren in Ellwangen (Jagst) als Sohn des Eberhard Biber und seiner Frau Elisabeth, geb. Weber
1964 - 1967	Grundschule in Ellwangen
1967 - 1976	Peutinger Gymnasium in Ellwangen
2. 6. 1976	Abitur
1976 - 1977	Wehrdienst
1977 - 1982	Studium an der Universität Tübingen mit den Fächern Biologie, Chemie und Geographie
1981	Staatsexamen in Geographie und Chemie
1981 - 1982	Wissenschaftliche Arbeit am Institut für Biologie I der Universität Tübingen unter Leitung von Prof. Dr. A. Hager mit dem Thema: Der Einfluß von organischen Säuren, Zuckerphosphaten und Licht auf die ATP-getriebene, chlorid-abhängige Ansäuerung mikrosomaler Vesikel von Maiskoleoptilen
1982	Staatsexamen in Biologie
1982 - 1984	Dissertation am Institut für Biologie I der Universität Tübingen unter Leitung von Prof. Dr. A. Hager mit dem Thema: Charakterisierung und Lokalisierung von ATPasen, Protonenpumpen und Ionentransportprozessen an mikrosomalen Membranen von Maiskoleoptilen
1982 - 1983	Wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie
11. 5. 1984	Eheschließung

Meine akademischen Lehrer waren:
Ammermann, Blume, Borsdorf, Braun, Bunke, Drumm, Engels, Erkert, Grell, Haas, Hager, Hanack, Hannß, Karger, Kopp, Lindner, Löschke, Möhres, Netzel, Oberwinkler, Pommer, Rähle, Rundel, Sailer, Sauer, Schwemmle, Seitz, Seyffert, Strähle, Suhr

Druck und Gesamtherstellung: Druckerei Bölk, Tübingen